

SOMMAIRE DES ACTES DU COLLOQUES

A/ POSTERS

P1 - Anticorps recombinants : Vers un renouveau de la thérapie anti-scorpionique.

Aubrey N., Muzard J., Juste M, Devaux C, Billiald

P2 - Effets des acides docosahecaénoïque et eicosapentaénoïque sur la croissance des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231.

Barascu Aurélia, Besson Pierre, Bougnoux Philippe et Jourdan Marie-Lise

P3 - Administration of bacterial components protect newborn mice against *Cryptosporidium parvum*.

Barrier M., Lamandé S., Mancassola R., Lagranderie M., Marchal G. and Laurent F

P4 - Détermination plasmatique d'inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH par CLHP-UV et CLHP-ESI-MS/MS

Bezy V., Ph. Morin, Ph. Couerbe, G. Leleu et L.A. Agrofoglio

P5 - Étude de l'implication de la gluconéogenèse et de la glycogénèse dans la cancérogenèse astrocytaire : nouvelles cibles thérapeutiques

Blin Marion, Ardourel Marie-Yvonne, Dufour Thierry, Nizard Sonia, Espérandieu Olga, Hévor Tobias & Cloix Jean-françois

P6 - Characterization of hepatotoxicity profiles and metabolism-related toxicity in rat liverbeads and wif-B9 cell line

Borde Françoise , François Lagelle, Virginie E. Bender, Michale Bouskila, Marie-Claire Bonnet, Pascal Brizard, Marie-Thérèse Masson, Stéphan Chevalier, Claude Charuel, Doris Cassio, Christine P. Biagini

P7 - Vasoactive properties of large pulmonary veins of rat.

Bronquard Cécile, Maupoil Véronique, Findlay Ian, Cosnay Pierre, Freslon Jean-Louis

P8 - PhenHoMut, un programme de mutagenèse aléatoire chez la souris pour identifier des mutations récessives affectant la morphogénèse.

Brulé Fabienne, Blanquet Véronique, Besson Vanessa, Anne Puech et Hérault Yann

P9 - Les facteurs de différenciation des cellules du cumulus liés à la qualité de l'Ovocyte humain

Cadoret V, ML Langlois, J Beylier, F Guérif, J Lansac et D Royère

P10 - Etude des peroxydations et des systèmes de protection radicalaires en relation avec la différenciation de trois lignées de betterave sucrière (*Beta vulgaris L. altissima*).

Causevic Adisa, Jourdain Caroline, Delaunay Alain, Vinterhalter Dragan, Hagège Daniel, Maury Stéphane.

P11 - Etude de la biocompatibilité de nouveaux matériaux d'enrobage à base d'alginate amphiphiles

Cohen-Jonathan Simone, Igor Chourpa, Marie-Christine Machet, Gérard Lorette, Florence Brunel, Philippe Maingault, Pierre Dubois

P12 - Activité électrique spontanée des neurones à GnRH.

Constantin Stéphanie, Duittoz Anne & Wray Susan

P13 - Synthèse d'analogues triantennés de MUC1 par ligation chimiosélective

Cremer Gaëlle-Anne, Lelièvre Dominique, Delmas Agnès

P14 - Transcriptomic analysis of vasculitis induced in rat mesenteric arteries by a phosphodiesterase 4 inhibitor

Dagues Nicolas, Valérie Pawlowski, Ghislaine Guigon, Claudia Garcia-Allen and Stephan Chevalier

P15 - Etude de l'expression de la sulfhydryl oxydase/quiescine Q6 humaine et des membres de la superfamille thiorédoxine impliqués dans la prolifération cellulaire.

Desmazes Claire, Pennucci Roberta, Esnard-Fève Annick, Leblond Valérie, Guyétant Serge et Esnard Frédéric.

P16 - La protéine MC1 d'archéobactérie : reconnaissance de séquences particulières

De Vuyst Guillaume, Alain Gervais, Françoise Culard

P17 - Effects of the polyclonal antibody anti-G21V on the cardiac h-5-HT4(e) receptors expressed in CHO cells depends upon receptor density

Di Scala E, Rose S, Gennetay D, Pingaud M, Argibay J, Cosnay P and Bozon V

P18 - Characterization of Salmonella Genomic Island 1 Multidrug Resistance Gene Clusters from *S. enterica* Serovar Agona, Belgium, 1992-2002

Doublet Benoît, Patrick Butaye, Hein Imberechts, David Boyd, Mickael R. Mulvey, Elisabeth Chaslus-Dancla, Axel Cloeckert

P19 -Etude des mécanismes d'action d'une nouvelle protéine cytotoxique : la Mitogaligine

Duneau Mélanie et Patrick Gonzalez

P20 - Biochemical analysis of the different prion protein isoforms present in reproductive fluids and sperm from the ram.

Ecroyd H., Dacheux J-L., Gatti J-L

P21 -Activité télomérase dans la genèse des lymphomes viro-induits par MDV : implication de la sous-unité ARN télomérase virale

Fagnet Laëtitia, Djeraba-Ait Lounis Aouatef et Rasschaert Denis

P22 - Fatal Mycobacterium tuberculosis infection in the absence of MyD88

Fremont Cécile , Michael B. Drennan, Valerie J.F. Quesniaux, Delphine Nicolle, Nicolas Noulin, Vladimir Yermeev, Lizette Fick, Muazzam Jacobs and Bernhard Ryffel.

P23 -Glycotargeting: oligonucleotide-glycocluster conjugates.

Frison N., Marceau P., Bousser M.T., Duverger E., Mayer R.V, Monsigny M. and Roche A.C.

P24 - Production de métabolites secondaires dans différents organes d'*Hypericum perforatum* L. régénérés à partir de cultures in vitro

Gadzovska Sonja, Kéravis Gérard, Maury Stéphane, Spasenoski Mirko, Hagège Daniel, Joseph Claude.

P25 - Evidence for functional b2-adrenergic receptors in guinea-pig heart muscle

Gannier F. E. , M. J. Malécot, G. Delaval, J. M. Lignon & C. O. Malécot

P26 - Identification de la tryptase comme l'enzyme de maturation de la trappine-2 en élafine, un inhibiteur des protéases à sérine de neutrophiles.

Guyot Nicolas, Zani Marie-Louise et Moreau Thierry

P27 - Conséquences sur la fonctionnalité de l'axe corticotrope d'une sélection génétique pour l'immobilité tonique chez la caille.

Hazard Dominique, Faure Jean-Michel, Guémené Daniel

P28 - Structure / function analysis of nuclear targeting in epidermal onion cells transfected by biolistic of a bHLH transcription factor and three Mariner transposases fused to the green fluorescent protein .

Hedhili Sabah , Demattéi Marie-Véronique , Thiersault Martine, Bigot Yves , Gantet Pascal

P29 - Caractérisation des Anticorps anti-eCG, produits chez les chèvres, lors des traitements d'induction et de synchronisation de l'oestrus et de l'ovulation.

Hervé Virginie, François Roy, Jean Bertin, Florian Guillou et Marie-Christine Maurel

P30 - Transcription and expression of plasmid DNA: dependence on polyethylenimine or lactosylated polyethyleneimine in polyplexes

Honore I, S. Grosse, N. Frison, F. Favatier, M. Monsigny, I. Fajac

P31 - Mesure et quantification des protéases à sérine des polynucléaires neutrophiles par de nouveaux substrats

Korkmaz Brice, Hazouard E., Attucci S., Gauthier F.

P32 - Questions raised by the use of rolipram, a phosphodiesterase inhibitor, in rat isolated vascular preparations

Korkmaz Céline, Maupoil Véronique, Chevalier Stephan and Freslon Jean-Louis

P33 - Control of the intestinal infection by cryptosporidium parvum does not required mesenteric lymph nodes and peyer's patches

Lacroix-Lamandé S., Barrier M., Mancassola R. and Laurent F.

P34 - Régulation de l'activité protéolytique de la cathepsine K : role majeur de la poche S2

Lecaille Fabien, Dieter Brömme et Gilles Lalmanach

P35 - Transferrine et fonction testiculaire

Lécureuil Charlotte, Fontaine Isabelle, Guillou Florian

P36 - Synthèse de 5-azaindolocarbazoles

Lefoix Myriam, Sylvain Routier, Jean-Yves Mérour, Gérard Coudert, Alain Pierré, Daniel-Henri Caignard, Pierre Renard

P37 - Conception et synthèse par ligation chimique d'un mime de la protéine cargo transmembranaire p23

Lelièvre Dominique, Cyril Favard, Bruno Antonny, Marc Chabre and Agnès Delmas.

P38 - Le Service d'Imagerie du CDTA du CNRS d'Orléans : une plate forme technologique dédiée à l'exploration fonctionnelle et au phénotypage des rongeurs transgéniques

Lerondel S, Le Mée M, Le Pape A..

P39 - Reversal of Isoproterenol effects on the electrocardiogram (ECG) of mice by carbachol: functional evidence for the expression of human GIRK2 subunit of KACH channel in FVB/Tg84 mice.

Lignon J.M. , Z. Bichler, F.E. Gannier, P. Cosnay, D. Migliore-Samour & C.O. Malécot.

P40 - Une nouvelle série de mutants alléliques affectant la voie de signalisation de KIT impliquée dans le maintien des cellules souches chez la souris

Magnol Laetitia, Leroux Stéphanie, Petit Joëlle, Fuchs Helmut, Hrabe de Angelis Martin, Puech Anne et Hérault Yann.

P41 - Les Macrophages Intravasculaires Pulmonaires (MIVP) : Caractérisation et implications physiopathologiques d'une population cellulaire atypique.

Ndoye O., S. Le Guellec - Massuard, S. Bernard, S. Lerondel, J. Pager, P. Diot, A. Le Pape

P42 - Vecteurs magnétiques d'anticancéreux : synthèse et caractérisation de nanoparticules composites d'oxydes de fer et de polymère biodégradable.

Ngaboni Okassa Lazare, Hervé Marchais, Laurence Douziech Eyrolles, Simone Cohen-Jonathan, Martin Soucé, Igor Chourpa, Pierre Dubois

P43 - Histidine phosphotransfer domain extinction by RNA interference suppresses a cytokinin signal transduction pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells.

Papon Nicolas, Amerin Vansiri, Jennifer Bremer, Jean-Claude Chénieux, Pascal Gantet, Marc Rideau, Joël Crèche .

P44 - Analyse structurale par cristallographie de l'interaction spécifique entre un enzyme de réparation de l'ADN (Fpg) et une molécule d'ADN endommagée.

Pereira de Jésus Karine, Laurence Serre, Charles Zelwer et Bertrand Castaing

P45 - Mort par apoptose d'astrocytes en culture

Picard Mélanie et Tobias Hévor

P46 - Chip et macropuces à ADN : deux outils pour la recherche des cibles de DSP1.

Rappailles Aurélien, Decoville Martine, Landemarre Ludovic et Locker Daniel.

P47 - Modulation par le cholestérol de la fluidité membranaire : influence sur l'activité des P-glycoprotéines chez *Haemonchus contortus*

Riou Mickaël, Fabrice Guégnard, Christine Koch et Dominique Kerboeuf

P48 - Délivrance de cytokines aviaires par un vecteur adénoviral: immunomodulation par l'IFN-g.

Rivas Christelle, Patrick Langlois et Pascale Quéré

P49 - Voltage-gated sodium current: invasion enhancer in a metastatic breast cancer cell line

Roger S. , P. Besson and J-Y Le Guennec

P50 - A comparative study of the NLS-dependent and the sugar-dependent nuclear imports

Rondanino Christine, Annie-Claude Roche and Michel Monsigny

P51 - Conception de 1,2,3-triazolo-carbanucléosides ciblant le virus de l'hépatite C (VHC) dans un système réplicon

Saito Y. , N. Joubert, V. Escuret, D. Durantel, F. Zoulim, R.F. Schinazi et L.A. Agrofoglio

P52 - Synthèse d'analogues du benzyltrozamicol, sondes potentielles utilisables en spect ou en pet pour visualiser et étudier le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine

Thaer Assaad, Sylvie Mavel, Patrick Emond, Marie-Laure Drossard, Moussa I. Diarra, Stanley M. Parson, Sylvie Chalon, Yves Frangin, Denis Guilloteau

P53 - Détermination du site d'action de la sécrétase impliquée dans libération de la forme germinale de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECAg).

Thimon V., Métayer S., Belghazi M., Dacheux J-L., Gatti J-L.

P54 - Etude de la pinocytose et de la cytotoxicité des vecteurs magnétiques d'anticancéreux

Voultoury Louise, Igor Chourpa, Claude Linassier, Laurence Douziech-Eyrolles et Pierre Dubois.

ooOoo

B/ CONFERENCES

C1 - Cell death and differentiation in a chronic myelogenous leukemia (CML) cell line Or when and how caspases may exert apoptotic and non-apoptotic functions

Jacquel Arnaud, Herrant Magali and Auberger Patrick

C2 - RM, SRM et Imagerie moléculaire", où comment obtenir des informations anatomiques et biochimiques sur les êtres vivants, de manière non-invasive et atraumatique

Beloeil Jean-Claude

C3 - Contrôle du cycle cellulaire et développement des plantes

Bergounioux Catherine

C4 - Intérêt de mariner comme outil de transfert d'ADN exogène ubiquitaire et site d'insertion spécifique.

Bigot Yves

C5 - Nano et microtechniques, nouvelles contributions dans les sciences du vivant

Faupel Michel.

C6 - Manipulations du génome de la souris pour l'étude du génome et la création de modèles de pathologies humaines

Brault Véronique, Besson Vanessa, Brulé Fabienne, Magnol Laetitia, Levasseur Françoise, Labbe Marine, Duchon Arnaud, Blanquet Véronique et Hérault Yann

C7 - Identification d'un gène humain inducteur de la mort cellulaire.

Legrand Alain, Charpentier Stéphane, Normand Thierry, Raimond Jacques, Dubois Martine, Duneau Mélanie, Gonzales Patrick, Guittaut Michaël

C8 - PPAR_: regulation of apoptosis and species differences

Roberts Ruth A.

C9 - Synthèse de molécules d'intérêt biologique : Azaindolocarbazoles et Naphtocarbazoles

Routier Sylvain

C10 - Apoptosis and Atherosclerosis

Tedgui Alain

C11 - Régulation du métabolisme musculaire par l'insuline : Particularités du modèle aviaire

Tesseraud Sophie , Bigot Karine, Vaudin Pascal, Duchene Sophie, Dupont Joëlle

C12 - Développement de nouveaux ligands spécifiques et affins des récepteurs mélatoninergiques

Viaud-Massuard Marie-Claude

ADDITIF

P 55 - Production de vecteurs de gènes faiblement immunogènes dérivés du papillomavirus humain de type 16

Carpentier G., Sadeyen J-R., Tourne S., Coursaget P.

P1

ANTICORPS RECOMBINANTS : VERS UN RENOUVEAU DE LA THERAPIE ANTI-SCORPIONIQUE.

Aubrey N.^{1,2}, Muzard J.³, Juste M.¹, Devaux C.², Billiald P.¹

¹ Faculté de Pharmacie, INRA UMR 483, 31 Avenue Monge, 37200 Tours,

² Faculté de Médecine Nord, CNRS UMR 6560, Bvd Dramard, 13916 Marseille,

³ Muséum national d'Histoire naturelle, USM505, 57 rue Cuvier, 75005 Paris

email : billiald@univ-tours.fr

Depuis une dizaine d'années, l'ingénierie moléculaire permet de concevoir de nouveaux formats de fragments d'anticorps avec des applications thérapeutiques potentielles dans des domaines variés. De nombreux essais cliniques sont en cours et une dizaine de molécules thérapeutiques ont déjà reçu une autorisation de mise sur le marché.

Dans le domaine des envenimations, l'injection de fragments d'anticorps polyclonaux préparés par protéolyse ménagée à partir d'immun-sérums hétérologues demeure le seul traitement spécifique. Cette pratique comporte de nombreux inconvénients, principalement une activité spécifique faible liée à une hétérogénéité des lots d'immun-sérums, des risques de réactions d'hypersensibilité, mais aussi de contamination par des agents pathogènes. Le développement et l'utilisation de nouveaux formats d'anticorps obtenus par voie recombinante pourrait être mieux appropriés en terme de tolérance, de biodisponibilité et de sécurité d'emploi.

A partir d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux neutralisant l'action des trois neurotoxines du venin de scorpion *Androctonus australis* actives sur les canaux sodium des cellules excitables et responsables des effets létaux du venin, nous avons conçu différents formats de fragments d'anticorps recombinants et évalué leurs propriétés structurales, fonctionnelles et pharmacologiques (Figure 1).

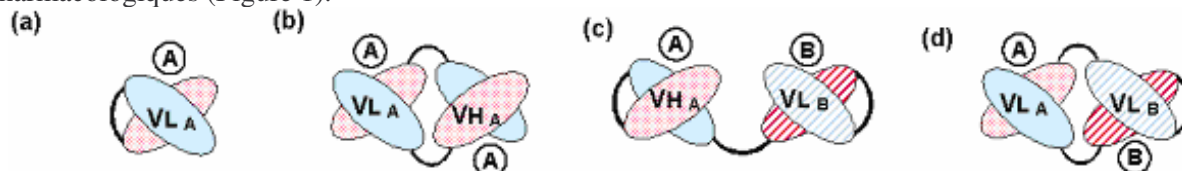


Figure 1. Fragments d'anticorps recombinants thérapeutiques anti-toxines de scorpion en cours d'évaluation. (a) scFv, (b) diabody, (c) scFvs en tandem, (d) single-chain Diabody.

Les résultats obtenus montrent que les fragments scFv (28 kDa) constitués uniquement des domaines variables d'un anticorps associés l'un à l'autre par un court peptide conservent une haute affinité pour la toxine contre laquelle ils sont dirigés et un pouvoir neutralisant élevé (FEBS Lett. 1999, 442: 183-8 ; Eur. J. Biochem. 2001, 268: 694-702). En revanche la très courte demi-vie plasmatique de ces scFvs limite leur intérêt pour des applications thérapeutiques. Des diabody, homodimères de scFv, d'une taille sensiblement équivalente à celle d'un Fab, mais bivalents conservent également une haute affinité pour leur antigène. Leur stabilité plasmatique est élevée et ils offrent un réel pouvoir protecteur, sur le modèle animal, dans des conditions semblables à celle d'une envenimation (Cell. Mol. Life Sci. 2003, 60 : 617-28). Enfin, nous aborderons les résultats obtenus avec des molécules de type single-chain diabody et scFv en tandem, constituées des domaines variables de deux anticorps, l'un dirigé contre la toxine AahII du venin, l'autre dirigé contre la toxine AahI et doué de réactivité croisée avec la toxine AahIII. Une molécule de ce type pourrait neutraliser l'ensemble des effets létaux du venin et servir de support au développement d'une nouvelle génération d'anti-venins à usage thérapeutique.

P2**EFFETS DES ACIDES DOCOSAHEXAENOÏQUE ET EICOSAPENTAENOÏQUE SUR LA CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES MDA-MB-231.**

Barascu Aurélia, Besson Pierre, Bougnoux Philippe et Jourdan Marie-Lise.

"Nutrition, Croissance et Cancer", INSERM EMI 02-11, Université F. Rabelais, 2 bis boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex. 02.47.47.47.76. p.73459. m.jourdan@chu-tours.fr

De nombreuses études ont démontré que les acides docosahexaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA), présents en grande quantité dans les huiles de poisson, inhibent *in vitro* la croissance de lignées épithéliales mammaires. L'objectif de l'étude est de déterminer, sur la lignée MDA-MB-231, si l'effet inhibiteur du DHA et de l'EPA est dû à une diminution de la prolifération et/ou à une augmentation de la mort cellulaire.

La prolifération a été évaluée par 1) quantification des cellules suivant une méthode de réduction des sels de tétrazolium (test MTT) et 2) analyse par cytométrie en flux (CMF) de la progression dans le cycle des cellules synchronisées. La mort cellulaire a été documentée par 1) évaluation de la cytotoxicité du DHA et de l'EPA (test MTT) et 2) analyse du taux d'apoptose par CMF.

Le DHA et l'EPA ont diminué, de façon dose-dépendante, la quantité de cellules MDA-MB-231. Parmi les autres acides gras testés (saturés, mono- et poly-insaturés), l'acide oléique n'a eu aucun effet quelle que soit la concentration utilisée. En synchronisant les cellules, nous avons mis en évidence que le DHA et l'EPA ralentissaient la progression dans le cycle par rapport au témoin (18:1n-9). Cet effet était dose-dépendant.

L'étude de la mort cellulaire a montré que le DHA et l'EPA étaient cytotoxiques ; ils augmentaient le taux de cellules apoptotiques de façon dose-dépendante.

Ces résultats montrent que le DHA et l'EPA inhibent la croissance des cellules MDA-MB-231 en diminuant la prolifération et en augmentant la mort cellulaire par apoptose.

P3

ADMINISTRATION OF BACTERIAL COMPONENTS PROTECT NEWBORN MICE AGAINST *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*.**Barrier M.¹, Lamandé S.¹, Mancassola R.¹, Lagranderie M.², Marchal G.² and Laurent F.¹**¹ Equipe Contrôle et Immunologie des Maladies à Protozoaires, INRA de Tours, 37380 Nouzilly France² Laboratoire de référence des Mycobactéries, Institut Pasteur, 75014 Paris France

Cryptosporidiosis is a zoonosis due to *Cryptosporidium parvum*, a protozoan parasite that infects intestinal epithelial cells and causes diarrhea in young or immunodeficient host. Newborn calves are infected earlier in their life by oral route, then get rid off the parasite in three weeks. An immunostimulation approach has been investigated in mice in order to stimulate the maturation of the mucosal immune system. Inactivated bacteria (BCG) or bacterial products (LPS, CpG-ODN) have been administered *per os* early after birth to induce a moderate and transient inflammation just before infection by the parasite. The treatments induce the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IFN γ) and a reduction of the parasitic load by 30 to 90%. The precise mechanisms, by which immunostimulation by bacterial products lead to subsequent decrease of *C. parvum* infection, are under investigation.

P4**DETERMINATION PLASMATIQUE D'INHIBITEURS NUCLEOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE DU VIH PAR CLHP-UV ET CLHP-ESI-MS/MS**

Bezy V¹, Ph. Morin¹, Ph. Couerbe², G. Leleu² et L.A. Agrofoglio^{1*}

¹ *Institut de Chimie Organique et Analytique - UMR 6005, Université d'Orléans, BP 6759
45067 Orléans - Fr.*

Tél : 02-3849-4582 Fax : 02-3841-7281

E-mail : luigi.agrofoglio@univ-orleans.fr

² *Bristol-Myers Squibb, Rueil Malmaison - Fr*

Les polythérapies anti-VIH actuelles associent des nucléosides inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH (INTIs) avec un ou plusieurs analogues non-nucléosidiques. Ces drogues ont des mécanismes d'action différents, et leur appartenance à des classes médicamenteuses différentes permet de limiter l'apparition de souches virales résistantes. Pour ajuster les doses thérapeutiques, mieux connaître la pharmacocinétique des molécules, étudier l'absorption et différentes interactions médicamenteuses, il est nécessaire de posséder des méthodes bioanalytiques pour le dosage simultané de plusieurs de ces médicament dans le plasma ou en milieu intracellulaire. Une méthode CLHP-UV pour l'analyse simultanée des sept INTIs ou de leurs formes administrées (ddI-ddA, d4T, ddC, 3TC, AZT, carbovir et ténofovir-PMPA) sur des plasmas de rat a été mise au point. La séparation de ces drogues a été réalisée par chromatographie de phase inverse sur une colonne ATLANTISTM dC₁₈. L'influence de la composition en modificateur organique de la phase mobile (eau/acétonitrile) ainsi que celle du pH a été réalisée et optimisée.

Les limites de quantification ont été déterminées sur plasma de rat après déprotéinisation et extraction sur support solide (HLB Oasis – Waters). Quelques limites de détection obtenues en UV et par spectrométrie de masse (ESI-MS/MS) sont comparées.

Ces travaux ont été réalisés avec le concours de l'Agence Nationale de Recherche contre le Sida (ANRS) et le SIDACTION. M. V.Bezy bénéficie d'une bourse de thèse CIFRE.

P5

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE LA GLUCONEOGENESE ET DE LA GLYCOGENESE DANS LA CANCEROGENESE ASTROCYTAIRE : NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

Blin Marion, Ardourel Marie-Yvonne, Dufour Thierry, Nizard Sonia, Espérandieu Olga, Hévor Tobias & Cloix Jean-françois LMCN – Université d'Orléans – Rue de Chartres – 45067 Orléans Cedex 2 Tél : 02 38 49 49 79 – Fax : 02 38 41 72 44 – Mél : marion.blin@univ-orleans.fr

Les astrocytomes sont des tumeurs cérébrales gliales qui constituent la plus grande part des tumeurs primitives du système nerveux central. Quelque soit le mode thérapeutique, la durée de survie de patients touchés par un glioblastome, la forme la plus grave des astrocytomes, n'excède pas un an. L'issue très négative des patients atteints de ce type de cancer nous incite à renforcer nos efforts pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie et à s'orienter vers de nouvelles cibles et nouveaux modes thérapeutiques. Dans un contexte thérapeutique délicat et malgré un certain nombre de problèmes, la thérapie génique peut s'avérer être une issue intéressante.

La genèse des astrocytomes est loin d'être établie. Cependant, il a pu être montré que le développement et la progression de tumeurs astrocytaires résultent en l'acquisition et l'accumulation d'altérations géniques. Conjointement à ces variations, des modifications du métabolisme glucidique sont observées. En effet, en parallèle de l'exacerbation des voies glycolytiques, il existe une accumulation de glycogène astrocytaire. Notre objectif est de démontrer la relation entre le taux de prolifération cellulaire et les voies gluco- et glyconéogénique. Dans ce but, nous avons transfecté une lignée cellulaire d'astrocytome humain avec des ADNc anti-sens de deux enzymes impliquées dans la synthèse de glycogène, la glycogène synthase (enzyme glycogénique) et la fructose-1,6-bisphosphatase (enzyme gluconéogénique). Des études préliminaires in vitro indiquent que ces ADNc anti-sens murins sous la dépendance d'un promoteur CMV inhibent significativement les capacités invasives et prolifératives de la lignée cellulaire d'astrocytome humain. Par conséquent, ces résultats prometteurs permettent de penser que les voies gluco- et glyco-néogéniques peuvent constituer de nouvelles cibles thérapeutiques, médicamenteuses ou géniques, dans le traitement des glioblastomes.

P6**CHARACTERIZATION OF HEPATOTOXICITY PROFILES AND METABOLISM-RELATED TOXICITY IN RAT LIVERBEADS AND WIF-B9 CELL LINE.**

Borde Françoise¹, François Lagelle¹, Virginie E. Bender¹, Michale Bouskila¹, Marie-Claire Bonnet¹, Pascal Brizard¹, Marie-Thérèse Masson¹, Stéphane Chevalier¹, Claude Charuel*¹, Doris Cassio², Christine P. Biagini¹

¹ PFIZER, Molecular and Cellular Toxicology Laboratory, Amboise, France. ² INSERM 442, Orsay, France.

The cytotoxicity profile of over 30 pharmaceutical compounds was evaluated in rat Liverbeads and in WIF-B9 cell line monitoring LDH release, MTT activity, ATP and GSH levels and cell morphology. Compound toxicity ranking was comparable in both models, erythromycin estolate, ANIT, retinoic acid and propranolol being the most toxic chemicals (EC50<200µM). Erythromycin, diclofenac, warfarin, galactosamine, valproic acid, ethionine, isoniazid and thioacetamide are examples of less toxic compounds. Marked differences were observed between EC50s for some compounds such as cyclosporine A (10 and 830µM) and warfarin (5900 and 1490µM) in WIF-B9 and Liverbeads, respectively. These differences are potentially linked to metabolism pathways. We evaluated the metabolic capacity of both models using competitive RT-PCR. Six rat isoforms were expressed in rat Liverbeads (CYP1A2, 2B1/2, 2C11, 2E1, 3A1 and 4A1). WIF-B9 expressed 4 rat isoforms (CYP 1A1, 2B1/2, 2E1 and 4A1) and 4 human isoforms (CYP 1A1, 2C, 2D6, 2E1) at 2-4 orders of magnitude lower than that of the rat forms. We are currently evaluating the induction potential of these rat and human P450 forms. Taken together, Liverbeads and WIF-B9 cells are complementary models to investigate metabolism-toxicity relationships *in vitro*.

P7

VASOACTIVE PROPERTIES OF LARGE PULMONARY VEINS OF RAT.

Bronquard Cécile, Maupoil Véronique, Findlay Ian, Cosnay Pierre, Freslon Jean-Louis.
UMR CNRS 6542 «Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires », Faculté des Sciences et
Techniques, Parc de Grandmont, 37200 TOURS, France.
Tel : 02 47 36 70 09; Fax : 02 47 36 71 12; e-mail : cbronquard@physio-a.univ-tours.fr

Pulmonary veins present a particular structure with cardiac muscle fibers extending from the left atrium. The PVs are a source of focal pacemaker activity which may initiate atrial fibrillation, the most common cardiac arrhythmia (Wellens, 2002). The vasoactive properties of these vessels, and particularly the role of the endothelium, have not been clearly described. Here, we examine the responses of rat large pulmonary veins (LPV) to vasoactive agents.

Segments of large pulmonary arteries (mean diameter $626 \pm 26 \mu\text{m}$) from male Wistar rats (400-550 g) were mounted in a Mulvany myograph under normalized tension for measurement of isometric force. Contraction and relaxation to different substances were investigated.

An optimal wall tension corresponding to an *in vivo* pressure of 10 mm Hg in the vein was determined. Phenyleprine, angiotensin I and II (10^{-9} - 10^{-5} M) did not contract LPV. U46619, a stable analog of thromboxan A₂, produced a concentration-dependent contraction of LPV ($EC_{50} = 1.1 \times 10^{-7}$ M, maximum of contraction = 0.17 mN/mm). Vasorelaxation was examined in LPV segments precontracted with U46619 (3×10^{-6} M). LPV did not relax in response to the endothelium-dependent vasodilators, acetylcholine and bradykinin (10^{-9} - 10^{-5} M). Isoprenaline induced a concentration-dependent relaxation of LPV ($EC_{50} = 7.7 \times 10^{-9}$ M, maximum = 69 % of the maximal contraction). This vasorelaxation was not affected by 30 min preincubation with L-NAME (100 μM) or indomethacin (10 μM) to respectively inhibit NO and prostaglandin synthesis. These results suggest that the endothelium does not mediate the vasorelaxation. Salbutamol, a specific β_2 receptor agonist, induced a relaxation similar to isoprenaline.

These results show that U46619 induces vasoconstriction in LPV and that relaxation relies on the involvement of the β_2 adrenergic receptor.

Wellens H.J.J. Pulmonary vein ablation in atrial fibrillation : hype or hope ? Circulation 2002, 102 :2562-2564.

P8**PHENHOMUT, UN PROGRAMME DE MUTAGENESE ALEATOIRE CHEZ LA SOURIS POUR IDENTIFIER DES MUTATIONS RECESSIVES AFFECTANT LA MORPHOGENESE.**

Brulé Fabienne, Blanquet Véronique, Besson Vanessa, Anne Puech* et Hérault Yann.

Laboratoire de Génétique Expérimentale et Moléculaire, CNRS-LGEM, FRE2358

Institut de Transgénèse, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2

Tel : 02 38 25 79 30 Fax : 02 38 25 79 30, mël : brule@cnrs-orleans.fr

* Centre National de Génotypage, 2 rue Gaston Crémieux CP 5721, 91057 Evry Cedex, France

Les différents programmes de mutagenèse aléatoire réalisés sur le génome de la souris ont pour but de créer des modèles animaux de pathologies humaines (Hrabé de Angelis *et al.*, 2000 Nat. Genet. 25, 444-447; Nolan *et al.*, 2000 Nat. Genet. 25, 440-443). Les mutations générées par l'éthylnitroso-urée (ENU), un agent chimique alkylant, sont identifiées grâce aux phénotypes associés à ces mutations, sans aucune connaissance préalable de l'identité du gène muté ou de sa fonction. Une telle approche vise à couvrir l'ensemble du génome de mutations afin d'attribuer à chaque gène, une fonction, et de identifier les réseaux génétiques complexes mis en œuvre dans les processus cellulaires.

Au Laboratoire de Génétique Expérimentale et Moléculaire à Orléans, en collaboration avec le Centre National de Génotypage à Evry, nous avons débuté, il y a deux ans, un programme de mutagenèse par ENU. Nous recherchons des mutations affectant la morphologie de la souris, le criblage est basé sur des analyses morphologiques qui comprennent 49 paramètres et sur la radiographie aux Rayons X pour mettre en évidence des anomalies du squelette. Plus de 60 familles de souris ont été analysées, dans lesquelles nous avons identifié plusieurs mutations induisant des dysmorphies. Les phénotypes observés sont les suivants : des anomalies dans la couleur du pelage, dans la morphologie du squelette ou encore dans leur comportement. Les tests de confirmation et la cartographie génétique des mutants nous permettent de proposer soit une région chromosomique d'intérêt, soit un gène candidat pour de nouvelles mutations impliquées dans le contrôle de la morphogénèse. Nous présentons ici les avancées du projet PhenHoMut, en particulier sur des mutants affectant la morphologie du squelette.

P9**LES FACTEURS DE DIFFERENCIATION DES CELLULES DU CUMULUS
LIES A LA QUALITE DE L'OVOCYTE HUMAIN**

Cadoret V, ML Langlois, J Beylier, F Guérif, J Lansac et D Royère

UMR 6073 Physiologie de la Reproduction et des Comportements INRA/CNRS/Université de
Tours

CHU Bretonneau 37000 Tours Tel : 02 47 47 87 69 Email : royere@med.univ-tours.fr

INRA PRC 37380 Nouzilly Tel : 02 47 42 79 97 Email : cadoret@tours.inra.fr

Lors des procédures de Fécondation In Vitro, il est très difficile d'apprécier la compétence au développement embryonnaire des ovocytes recueillis. La qualité de l'ovocyte ne peut être actuellement appréciée que par des critères grossiers tels les caractéristiques morphologiques des cellules périovocytaires (cumulus) ou la maturité nucléaire. Le dialogue entre cellules péri-ovocytaires et l'ovocyte participe à l'acquisition de la compétence au développement. L'étude directe des cellules du cumulus qui sont séparées de l'ovocyte lors du recours à l'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) nous a permis cette approche sans altérer l'intégrité de l'ovocyte.

Les données expérimentales chez l'animal ont permis d'identifier certains facteurs de différenciation induits lors du pic préovulatoire de LH et provenant des cellules du cumulus : la Cyclo-oxygénase 2 (Cox2) catalysant la synthèse de prostaglandines, la protéine StAR permettant le développement d'une stéroïdogenèse de novo et la connexine 43 dont l'état de phosphorylation varie en période ovulatoire.

L'expression de ces facteurs de différenciation en terme d'ARN et de protéines par les cellules de cumulus humaines a été évaluée en fonction de la maturité nucléaire des ovocytes et des caractéristiques des cohortes embryonnaires obtenues. L'expression de tous ces facteurs a été confirmée, l'approche en RT-PCR nous permettant de valider l'analyse au niveau d'un seul cumulus. Cette approche nous permettra de singulariser le devenir de chaque ovocyte en terme de qualité embryonnaire avec l'expression des facteurs considérés. A l'aide d'abord d'une quantification relative puis par PCR en temps réel, le projet vise à évaluer la relation entre le niveau d'expression de ces facteurs et l'aptitude au développement de l'ovocyte.

P10**ETUDE DES PEROXYDATIONS ET DES SYSTEMES DE PROTECTION RADICALAIRES EN RELATION AVEC LA DIFFERENCIATION DE TROIS LIGNEES DE BETTERAVE SUCRIERE (*BETA VULGARIS L. ALTISSIMA*).**

Causevic Adisa^{1,2,3}, Jourdain Caroline¹, Delaunay Alain¹, Vinterhalter Dragan², Hagège Daniel¹, Maury Stéphane¹.

1- LBLGC UPRES EA 1207, Fac. Sciences, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans
Tel / Fax : 02 38 49 47 21. stephane.maury@univ-orleans.fr.

2- Université de Sarajevo, Bosnie-Herzégovine.

3- INGEB, Sarajevo, Bosnie-Herzégovine.

La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones modifient la structure de la chromatine et par conséquence l'expression de gènes : on parle de contrôle épigénétique. Un système expérimental de cultures cellulaires *in vitro* de betterave sucrière présentant différents stades de différenciation a été utilisé. Des résultats obtenus récemment sur ces cultures traitées par différentes drogues hyper-, hypométhylantes ou hyperacétylantes ont permis de montrer que la différenciation cellulaire était sous contrôle épigénétique. Les formes activées de l'oxygène (FAO) joueraient un rôle dans la différenciation cellulaire animale. Leur rôle éventuel restait à déterminer chez les cellules végétales. Il paraissait donc intéressant d'étudier l'état de peroxydation et de protection radicalaire de ces cultures traitées ou non avec diverses drogues modifiant la différenciation cellulaire.

Les trois lignées étudiées (N, HO et HNO) ne semblent pas être dans le même état de stress oxydant du fait des différences notées dans les marqueurs de peroxydation des lipides membranaires. De façon analogue, l'activation des mécanismes de détoxification enzymatique ou non enzymatique contre les FAO semble propre à chaque lignée.

La modification de l'état de différenciation des cellules, induite par les traitements hypo, hyperméthylant ou hyperacétylant, est accompagnée par une modification de certains paramètres antioxydants. L'analyse statistique des résultats obtenus permet de corrélérer le taux de méthylation de l'ADN (et donc l'état de différenciation) avec les variations observées des paramètres de détoxification. L'état de différenciation des lignées cellulaires de betterave sucrière semble donc lié à un état oxydant et à une protection antiradicalaire définis.

P11

ETUDE DE LA BIOCOMPATIBILITE DE NOUVEAUX MATERIAUX D'ENROBAGE A BASE D'ALGINATES AMPHIPHILES

Simone Cohen-Jonathan,^a Igor Chourpa,^{a*} Marie-Christine Machet,^b Gérard Lorette,^c Florence Brunel,^d Philippe Maingault,^d Pierre Dubois.^a

^a Laboratoire de Chimie Analytique, EA 2098 PIMIR, UFR Pharmacie de Tours.

^b Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, , CHRU Trousseau, Tours.

^c Département de Dermatologie, CHRU Trousseau, Tours.

^d Laboratoires Brothier, 49590 Fontevraud l'Abbaye.

Les alginates, sous forme de sel de sodium sont considérés comme des matériaux biocompatibles, non toxiques et biodégradables ce qui les rend aptes à de nombreuses applications biomédicales. Ils sont, à ce titre, très largement employés dans l'industrie pharmaceutique en qualité d'excipient et d'agent d'encapsulation. Toutefois, à l'état natif ils sont inaptes à former des gels autres que les gels irréversibles calciques. Or, l'apport exogène de calcium est susceptible d'induire des réactions non souhaitables dans un milieu biologique. En substituant chimiquement les alginates par une chaîne polycarbonée hydrophobe sur des résidus uroniques on obtient une nouvelle classe de polymères amphiphiles capables de s'auto-assembler sans utilisation de calcium.

Dans cette étude nous avons examiné la biocompatibilité de nouveaux alginates amphiphiles (AA-C₁₂, substitués sur 10% des résidus uroniques) en la comparant à celle d'alginates naturels (AN). Dans ce but nous avons implanté ces substrats chez le rat (Wistar, adulte, mâle) par injection sous cutanée de solutions aqueuses diluées de part et d'autre du rachis au niveau lombaire. Au 4^{ème}, 7^{ème}, 14^{ème} et 28^{ème} jour après implantation les implants et les tissus avoisinants sont prélevés et examinés histologiquement et par spectroscopie Raman.

Les deux types d'implants sont cliniquement bien tolérés par tous les animaux.

Pour une faible durée d'implantation (4 et 7 jours), l'observation clinique est analogue quel que soit le matériau implanté. L'histopathologie montre un granulome bien circonscrit avec une pseudoencapsulation associée à des cellules inflammatoires prédominant en périphérie.

Au-delà de 14 jours d'implantation les différences entre AN et AA sont plus caractérisées. La réduction de volume et de la biocolonisation des implants sont particulièrement prononcés pour AA ; la biorésorption est donc plus rapide pour AA que pour AN.

La cartographie moléculaire par spectroscopie Raman montre que les deux types d'implants sont particulièrement enrichis en protéines plasmatiques, y compris pour les faibles durées d'implantation. Les spectres Raman de l'interface tissu-implant sont en accord avec nos précédents résultats montrant les interactions électrostatiques qui s'établissent *in vitro* entre alginates et protéines de sérum. Par ailleurs dans les implants AA on observe des éléments lipidiques dont la quantité augmente avec la durée de l'implantation.

En conclusion, ces nouveaux alginates amphiphiles montrent une bonne biocompatibilité *in vivo*. Ces résultats confortent notre travail sur la recherche de nouveaux systèmes vecteurs de principe actif pour une délivrance sur le site même de la lésion à traiter.

*auteur correspondant : tél. 02-47-36-71-62 ; fax 02-47-36-71-63 ; chourpa@univ-tours.fr

P12

ACTIVITE ELECTRIQUE SPONTANEE DES NEURONES A GNRH.

Constantin Stéphanie^{1,2}, Duittoz Anne¹ & Wray Susan²

¹ UMR6073, INRA, 37380 Nouzilly, France, tél 0247427782, fax 0247427743, sconstan@tours.inra.fr, ² NINDS, National Institutes of Health, Bethesda, USA.

La « *gonadotropin release hormone* » (GnRH) joue un rôle fondamental dans la régulation de la reproduction. Les neurones qui synthétisent ce neuropeptide sont répartis au sein de l'hypothalamus, et sécrètent la GnRH de manière pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Cette pulsatilité est une propriété indispensable dont les mécanismes restent obscurs. Le but de cette étude a été de caractériser l'activité électrique spontanée (AES) de neurones issus de cultures primaires d'explants olfactifs de souris afin d'établir une éventuelle relation entre l'AES et la pulsatilité. Pour cela, les neurones à GnRH maintenus dans des explants olfactifs de souris (E11.5) sont enregistrés électrophysiologiquement après 8-11 jours *in vitro*. La solution contrôle est un milieu défini sans sérum. Pour induire les perturbations, la tétrodotoxine (TTX), bloqueur des canaux sodiques et le nickel (Ni), bloqueur des canaux calciques de type-T et la picrotoxine (PIC), antagoniste des récepteurs GABA_A, sont ajoutés à la solution contrôle. En condition contrôle, les neurones à GnRH présentent une AES dont la fréquence est de 1.84 ± 0.17 Hz, complètement bloquée par la TTX. L'AES des neurones est analysée et des « bursts » d'activité électrique sont détectés. Par autocorrélation, la répartition de ces « bursts » montre une périodicité de 18.57 ± 0.57 min. L'addition de Ni réduit considérablement l'AES. La fréquence moyenne diminue à 0.61 ± 0.21 Hz et l'intervalle de périodicité passe à 26.25 min. En présence de PIC, l'AES est réduite à 0.98 ± 0.25 Hz et l'intervalle de périodicité atteint 23.75 min. Cette étude montre que la génération de l'AES des neurones à GnRH implique les canaux sodiques et les canaux calciques de type-T. Les bursts détectés apparaissent périodiquement. Cette périodicité est similaire à celle trouvée précédemment dans les oscillations calciques synchronisées ~18 min. La perturbation avec un bloqueur des canaux calciques de type-T altère la périodicité et implique ces canaux dans ce phénomène. De plus, le rôle des signaux GABAergiques dans la genèse de l'activité électrique est confirmé. Ainsi, ces résultats suggèrent que les neurones à GnRH présentent des changements périodiques de l'AES qui coïncident avec la sécrétion.

P13

SYNTHESE D'ANALOGUES TRIANTENNES DE MUC1 PAR LIGATION CHIMIOSELECTIVE

Cremer Gaëlle-Anne *, Lelièvre Dominique, Delmas Agnès

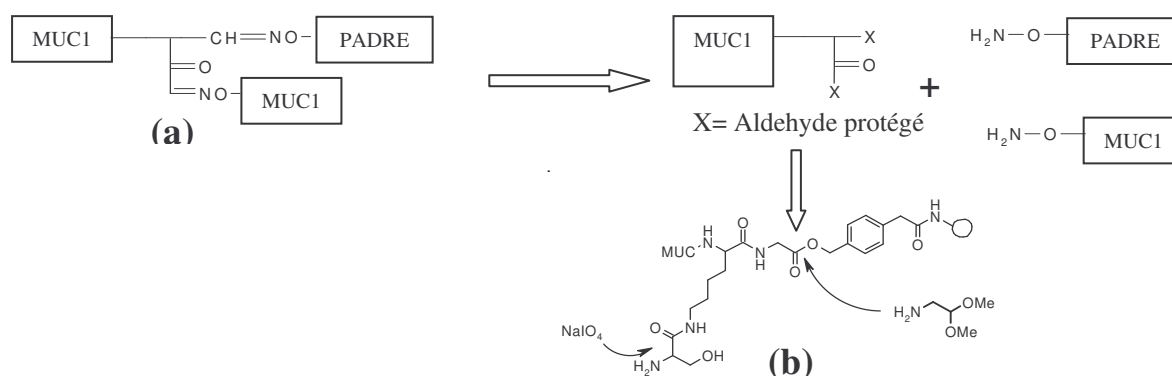
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2

cremer@cnrs-orleans.fr

La mucine, composée d'unités répétitives (PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA), est surexprimée dans de nombreuses tumeurs épithéliales où elle est sousglycosylée. C'est donc un bon candidat pour une thérapie vaccinale anticancéreuse. Dans ce contexte, nous proposons de synthétiser des immunogènes qui seraient à la fois assez semblables et suffisamment différents de l'antigène naturel pour permettre de franchir la barrière de tolérance immunitaire chez l'homme. Pour cela nous cherchons à présenter les unités de répétition sur plusieurs branches d'une construction peptidique et à introduire entre elles des liaisons pseudopeptidiques. De plus, pour induire une réponse immunitaire efficace, une des branches sera constituée d'un épitope T universel (épitope PADRE).

Nous avons réalisé la construction d'une chimère à trois branches liées par des liaisons oximes. Deux des branches sont constituées d'une unité répétitive de MUC1 et la troisième de l'épitope PADRE (a). L'unité répétitive MUC1 et l'épitope PADRE ont été élaborés par synthèse peptidique sur support solide. Les liaisons entre les différents blocs ont été réalisées par ligation chimique entre des fonctions aldéhydes et des fonctions aminoxy pour donner les liaisons oximes.

La chimère peptidique a été synthétisée à partir d'un peptide contenant une unité répétitive de MUC1 portant deux fonctions aldéhyde potentielles (b). Une première fonction aldéhyde C-terminale, masquée sous forme d'acétal, est obtenue lors du décrochage du peptide de la résine par aminolyse du bras PAM par l'acétaldéhyde-diméthylacétal (Lelièvre et al. 2002). La génération d'une seconde fonction aldéhyde par oxydation d'une sérine fixée sur l' α -NH₂ d'une lysine permet une première ligation avec un motif MUC1. Après déprotection de l'acétal par l'acide trifluoacétique, une seconde ligation avec le motif PADRE est alors réalisée.



Afin d'imiter au mieux la mucine présente à surface des cellules épithéliales des essais de glycosylation enzymatique seront très prochainement effectués. Des test d'antigénicité seront également réalisés et la réponse immune sera évaluée dans un modèle murin.

Références.

D. Lelièvre, O. Turpin, S. El Kazzouli, A. Delmas. 2002. *Tetrahedron*. 58 : 5525-5533

P14

**TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF VASCULITIS INDUCED IN RAT
MESENTERIC ARTERIES BY A PHOSPHODIESTERASE 4 INHIBITOR**

Dagues Nicolas¹, Valérie Pawlowski¹, Ghislaine Guigon¹, Claudia Garcia-Allen² and Stephan Chevalier¹. *PFIZER Global R&D* ¹*Molecular and Cellular Toxicology Department, Amboise, France and* ²*Genetic Technologies, Sandwich, England.*

Adresse: Pfizer Global R&D, Département de Toxicologie moléculaire et cellulaire, ZI Pocé sur Cisse, BP159, 37401 Amboise Cedex.

Tél / Fax : 02-47-23-77-78 / 02-47-23-79-40

Mél : stephan.chevalier@pfizer.com

Vasculitis is a relatively common finding during the pre-clinical toxicity testing of drug candidates. Vasculitis has drawn increased attention since the development of drugs has been directly affected by vasculitis observed in animal toxicology studies. The rat appears to be the most sensitive species for developing vasculitis in the mesenteric tissues after exposure to phosphodiesterase (PDE) inhibitors. Despite extensive pre-clinical and clinical studies, the mechanisms of toxicity induced by chemicals or drug leading to toxic vasculitis are largely unknown. Sprague Dawley rats were treated with a selective PDE4 inhibitor and several tissues, including mesenteric arteries, were collected for histopathological observations and gene expression analysis. Real-Time RT-PCR analysis of cytokines expression in mesenteric tissue was performed. The Affymetrix GeneChip® technology, that allows one to monitor the expression of around 8,800 rat genes on a array (Rat Genome_U34A), was used in order to identify potential biomarkers and to better understand the molecular mechanisms of PDE inhibitor-induced vasculitis in rats. 226 probes features with significant altered expression after treatment with the PDE4 inhibitor were identified. The genes with altered expression are involved in inflammation, oxidative stress and regulation of vascular tone. Taken together, the data analysis supports the hypothesis that the vasculitis induced in rat mesenteric arteries by the PDE4 inhibitor could be the consequence of haemodynamic changes due to an exacerbation of the compound's pharmacological effect.

P15

ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA SULFHYDRYL OXYDASE/QUIESCINE Q6 HUMAINE ET DES MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE THIOREDOXINE IMPLIQUES DANS LA PROLIFERATION CELLULAIRE.

Desmazes Claire, Pennucci Roberta, Esnard-Fève Annick, Leblond Valérie, Guyétant Serge et Esnard Frédéric

EMI-U 0010, Faculté de Médecine, 2 bis bd Tonnellé, 37032 Tours

Tél : 02-47-36-62-06 ; Mèl : esnard@univ-tours.fr

En France, 25 000 nouveaux cas de cancer broncho-pulmonaire sont reconnus chaque année, 22 000 vont décéder en quelques mois en faisant la première cause de décès par cancer chez l'homme. Parmi les altérations qui accompagnent la cancérisation, un déséquilibre de l'environnement redox peut engendrer des stress oxydatifs qui modifient le métabolisme des thiols et des ponts disulfure dont dépendent de nombreux phénomènes (adhésion, protéolyse membranaire, activation de facteur de transcription). Ces modifications peuvent entraîner une résistance aux agents thérapeutiques ou aux phénomènes apoptotiques, favorisant ainsi la survie et/ou le développement tumoral. Plusieurs molécules appartenant à la superfamille de la thiorédoxine (TRX) participent au métabolisme des ponts disulfures, dont la nouvelle famille de flavoenzymes, les sulfhydryl oxydases (SOx). La SOx de rat a été caractérisée et clonée au laboratoire ⁽¹⁾, elle catalyse la réaction : $2 \text{ R-SH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-S-S-H} + \text{H}_2\text{O}_2$. Deux ADNc correspondants ont été décrits chez l'homme dans des lignées pulmonaires sous le terme de Cell Growth Inhibiting Factor ou quiescine Q6. Notre objectif est de valider des outils pour quantifier l'expression SOx/Q6 dans les tumeurs bronchiques et de produire la protéine SOx/Q6 de façon à obtenir des outils nécessaires à son étude biochimique. Nous avons alors extrait la matrice d'ADNc indispensable à l'établissement de la gamme d'étalonnage de PCR en temps réel à partir de la lignée de fibroblaste pulmonaire humain WI38. La conception de couples d'amorces nous a permis de mettre en évidence une expression des deux formes de SOx/Q6 à partir des ARN totaux des cellules WI38. Nous comparons actuellement par PCR en temps réel, la quantité de messagers SOx/Q6 présents dans des tissus sains ou tumoraux issus de patients atteints de carcinome épidermoïde ou d'adénocarcinome, en corrélation avec l'expression des autres gènes de la superfamille TRX afin de comprendre le contexte global de formation des ponts disulfure dans les cellules tumorales. Dans un second temps, en analysant l'incidence des modifications d'expression sur la sensibilité aux anti-cancéreux, nous pourrions dire si ces molécules, impliquées dans le métabolisme des thiols et des ponts disulfures, peuvent être considérées comme de nouvelles cibles de thérapies anti-tumorales dans le traitement des cancers pulmonaires.

(1) Rat Seminal Vesicle FAD-dependent Sulhydryl Oxydase (2001). Benayoun, B., Esnard-Fève, A., Castella, S., Courty, Y. And Esnard, F. J. Biol. Chem. 276, 13830-13837

P16**LA PROTEINE MC1 D'ARCHEABACTERIE : RECONNAISSANCE DE SEQUENCES PARTICULIERES**

De Vuyst Guillaume, Alain Gervais, Françoise Culard

Centre de Biophysique Moléculaire, rue Charles SADRON, 45071 Orléans cedex France

La protéine MC1 (Methanogen Chromosomal protein 1) est une petite protéine très abondante chez les archeobactéries de la famille des *Methanisarcines*. Cette protéine basique se fixe sur l'ADN avec une affinité forte. Dans le complexe, l'ADN est fortement courbé.

Pour déterminer si comme beaucoup de protéines structurales, la protéine MC1 est capable ou non d'interagir plus fortement avec certains types de séquences, nous avons utilisé la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). Cette technique nous a permis d'isoler l'ensemble des séquences préférentiellement reconnues par la protéine MC1 de *Methanosarcina thermophila*. Un cycle SELEX se décompose en trois phases : sélection des séquences de haute affinité par la protéine ; purification par gel retard des séquences sélectionnées ; amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction). Après 10 cycles de sélection, 9 séquences de haute affinité pour MC1 ont été isolées et, une séquence consensus a été déterminée. L'affinité de la protéine pour ces différentes séquences a été étudiée par gel retard (mesure de vitesse de dissociation et constante d'équilibre). Le mode de fixation de la protéine sur l'ADN a ensuite été déterminé par différentes empreintes moléculaires (diméthyl sulfate, radicaux OH).

P17

EFFECTS OF THE POLYCLONAL ANTIBODY ANTI-G21V ON THE CARDIAC H-5-HT_{4(E)} RECEPTORS EXPRESSED IN CHO CELLS DEPENDS UPON RECEPTOR DENSITY

Di Scala E, Rose S, Gennetay D, Pingaud M, Argibay J, Cosnay P and Bozon V

UMR CNRS 6542, Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Tours, France.

Author for correspondence : Véronique Bozon, Telephone : (33) 2 47 36 70 12. Fax : (33) 2 47 36 71 12. e-mail : bozon@univ-tours.fr

5-HT induces an increase in frequency and amplitude of contractile force in human heart through stimulation of the h5-HT₄ receptor. This receptor is functional in atrial cells and induces the production of cAMP. Arrhythmic contractions have been observed in human atrial fragments following 5-HT incubation, suggesting that the 5-HT₄ receptor could be involved in the development of atrial fibrillation. For 30% of atrial arrhythmia, an autoimmune origin has been proposed and the goal of this work was to assess the effects of the polyclonal antibody anti-G21V on h5-HT_{4(e)} receptor activity CHO cells. The h5-HT₄ GPCR receptor, could be a target for autoantibodies.

This work was realized on CHO clone cells that stably rather than transiently expressed the h5-HT_{4e} receptor at the cell surface in an active form and at different density (high density : clone 1 and low density : clone 2). Both clones showed similar EC₅₀ (32 and 13 nM) for 5-HT evoking cAMP production. The antibody anti-G21V had no effect upon either basal cAMP or 5-HT evoked increases in cAMP in clone 1 CHO cells. On the other hand, in clone 2 CHO cells anti-G21V reduced basal cAMP and reduced the 5-HT evoked increase in cAMP when the antibody was applied to the cells before, but not after, 5-HT. These results suggest that the antibody anti-G21V acts upon human heart 5-HT₄ receptors as an *inverse agonist* and an *antagonist* when receptors are expressed at low and physiologically relevant density.

P18

CHARACTERIZATION OF *SALMONELLA* GENOMIC ISLAND 1 MULTIDRUG RESISTANCE GENE CLUSTERS FROM *S. ENTERICA* SEROVAR AGONA, BELGIUM, 1992-2002

Doublet Benoît,¹ Patrick Butaye,² Hein Imberechts,² David Boyd,³ Mickael R. Mulvey,³ Elisabeth Chaslus- Dancla,¹ Axel Cloeckaert¹

INRA¹ UR 086-BASE 37380 Nouzilly tél : 0247427329 fax :0247427774 e-mail : doublet@tours.inra.fr , VAR², Brussels, Belgium, and National Microbiology Laboratory³, Winnipeg, Canada

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) harbors a multidrug resistance (MDR) gene cluster and was previously identified in *S. enterica* serovars Typhimurium DT104, Agona, Paratyphi B and Albany. Most often this MDR gene cluster, composed of integrons, confers resistance to ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulfonamides and tetracyclines. However, variant SGI1 MDR gene clusters have also been identified in serovars Typhimurium DT104, Agona and Albany. They confer consequently different MDR phenotypes and were classified as SGI1-A to -F. A retrospective study was undertaken to characterize MDR regions from serovar Agona strains harboring SGI1 isolated from poultry in Belgium, between 1992 to 2002. 172 serovar Agona isolates, displaying resistance to at least one antibiotic, were studied for the presence of SGI1. SGI1 and MDR regions were characterized by PCR-mapping. Genetic relationship of serovar Agona isolates was analyzed by PFGE. SGI1 was detected in 95 serovar Agona strains. The most prevalent variant was SGI1-A (85 %) which harbors the additional unusual orf513 integron with the *dfrA10* trimethoprim resistance gene. A new variant SGI1 MDR gene cluster, named SGI1-G, was identified in two strains. It consisted of the *pse-1* integron, as in SGI1-B, but with additional insertion of the orf513/*dfrA10* integron-like structure. Seven isolates displaying the typical SGI1 antibiotic resistance profile (ApCmFfSmSpSuTc) showed genetic variation at the 3' end of SGI1. These strains harbored the insertion of the common region (CR) that includes orf513, coding for a putative transposase/recombinase, as in SGI1-A, -D, and -G. However, downstream the end of CR, they presented different 7.4 to 8.5 kb large deletions of the SGI1 3' end that extended to the chromosomal genes *yieE* and *yieF*. These results suggest a possible role of CR in deletion formation as has been reported for some insertion sequences. PFGE analysis showed that all the serovar Agona SGI1-carrying strains belonged to a single clone. SGI1 is largely encountered in serovar Agona strains isolated from poultry in Belgium, the most prevalent variant being SGI1-A. SGI1 MDR region undergoes recombinational events resulting in a diversity of antibiotic resistance gene clusters.

P19

ETUDE DES MECANISMES D'ACTION D'UNE NOUVELLE PROTEINE CYTOTOXIQUE : LA MITOGALIGINE

Duneau Mélanie et Patrick Gonzalez

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Rue Charles Sadron 45701 Orléans
cedex 02 France Tél : 02 38 25 55 36 Fax : 02 38 25 78 07

duneau@cnrs-orleans.fr, gonzale@cnrs-orleans.fr

Le gène de la galectine-3 humaine contient un gène interne cytotoxique : *galig* dont l'expression induit la mort cellulaire (1). *Galig* produit deux protéines, la Cytogaligine et la Mitogaligine, respectivement localisées dans le cytoplasme et les mitochondries.

L'expression de *galig* dans des cellules transfectées induit des modifications morphologiques et biochimiques conduisant à la mort cellulaire. Des résultats préliminaires suggèrent que l'activité cytotoxique de *galig* est médiée par l'action de la Mitogaligine sur les mitochondries. A l'image des protéines pro-apoptotiques Bax (2) ou tBid, la Mitogaligine induit la libération d'un effecteur apoptotique: le cytochrome *c*, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. En raison de sa participation à l'activation de la voie des caspases, sa libération cytosolique constitue une étape clé dans la mort cellulaire programmée. Afin de comprendre les mécanismes d'action de la Mitogaligine, nous avons étudié les effets d'un peptide synthétique dénommé Mitoc dérivé de la protéine. En présence de mitochondries isolées, ce peptide cytotoxique induit la libération de cytochrome *c*. Nous avons également testé les interactions de ce peptide avec des liposomes ainsi que son activité de perméabilisation des membranes. Les résultats montrent que Mitoc possède la capacité intrinsèque de déstabiliser et d'agrèger des membranes anioniques. Ils soulignent l'importance de deux paramètres : les interactions électrostatiques et la composition en phospholipides de la membrane. Plus particulièrement, la cardiolipine, un phospholipide anionique spécifique de la mitochondrie pourrait intervenir dans l'interaction de la Mitogaligine avec la membrane mitochondriale et être impliqué dans le processus de perméabilisation.

(1) Guittaut & al. 2001 J. Biol. Chem. 276, (4) :2652-2657

(2) Hardwick & al. 2002 Mol. Cell. 10, (5) :963-965

P20

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE DIFFERENT PRION PROTEIN ISOFORMS PRESENT IN REPRODUCTIVE FLUIDS AND SPERM FROM THE RAM.

Ecroyd H., Dacheux J-L., Gatti J-L.

Gamète Male et Fertilité, UMR 6073 INRA-CNRS, Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA Nouzilly, 37380 Monnaie, France Tel : 33 247 427 803 Fax : 33 247 427 743

Cellular prion protein (Prp^c) is a glycoprotein usually associated with membranes via its glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. We have previously reported that, in the male reproductive fluids, soluble isoforms of the Prp^c were also present (1). We have used antibodies against the N-terminal, the C-terminal (above the GPI-anchor site), and the recombinant PrP protein to further investigate the different Prp^c isoforms in the ram reproductive fluid and sperm. In fluid from the cauda epididymis and in seminal plasma, all antibodies recognize at least three different isoforms of the Prp^c. Deglycosylation resulted in a shift in the apparent molecular weight of all the isoforms and immunoblotting indicated that both N-terminally truncated, and C-terminally truncated (lacking the GPI-anchor site) isoforms of prion are present within the fluid. Furthermore, our studies show that Prp^c is also associated with small membranous vesicles (epididymosomes) present within the reproductive fluid of the male, via its GPI-anchor since the C-terminally directed antibody reacted with these vesicles. In ram sperm, Prp^c protein was found to be present and processed during transit along the epididymis; the protein is mainly associated with the cytoplasmic droplet that is lost from the sperm upon ejaculation.

Together these results show that in the reproductive fluid of the male, both glycosylated and proteolytic isoforms of the prion protein are present. In addition, we provide evidence for the presence of prion protein on membranous vesicles present in fluid from the reproductive tract of the male. Our results also suggest that whilst prion protein is associated with sperm, it is mostly present in the cytoplasmic droplet and thus may not have a functional role in the fully differentiated spermatozoon.

1. Gatti, J-L., *et al.*, (2002) *Biology of Reproduction*. **67**: 393-400.

P21**ACTIVITE TELOMERASE DANS LA GENESE DES LYMPHOMES VIRO-INDUITS PAR MDV : IMPLICATION DE LA SOUS-UNITE ARN TELOMERASE VIRALE**

Fragnet Laëtitia, Djeraba-Ait Lounis Aouatef et Rasschaert Denis
Centre de recherche INRA de Tours, UR086, Laboratoire de virologie et barrière d'espèce,
37380 NOUZILLY

La télomérase est une ribonucléoprotéine qui assure l'élongation des télomères, participant ainsi au maintien de l'intégrité du patrimoine génétique. Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence une étroite corrélation entre l'expression de l'activité télomérase et les processus d'immortalisation cellulaire. En effet, la télomérase semble impliquée dans plus de 85% des cancers humains. Elle est composée d'une sous-unité protéique (TERT) et d'une sous-unité matricielle ARN (TR). Bien qu'une expression d'activité télomérase ait été observée suite à certaines infections virales, notamment par des herpesvirus, aucune composante virale ne semblait être associée directement à la télomérase. Aussi, nous avons identifié pour la première fois une sous-unité TR d'origine virale (vTR) dans le génome du virus de la maladie de Marek (MDV). Cet *alpha*-herpesvirus est responsable de l'apparition de lymphomes T chez le poulet, son hôte naturel. Actuellement, les 2 vaccins utilisés en France permettent une protection efficace contre la tumorigénèse viro-induite, mais n'entravent pas la multiplication viral, assurant ainsi la pérennité du virus dans les élevages avicoles. Du fait de la forte homologie de séquence (88%) entre les sous-unités virale vTR et aviaire, cTR, se traduisant par une grande conservation des domaines fonctionnels essentiels à l'activité télomérase, nous avons conduit une étude comparative de ces 2 composantes. *In vitro*, en système hétérologue murin consistant en des cellules invalidées pour la sous-unité endogène mTR, nous avons démontré que vTR reconstitue environ 6 fois plus efficacement l'activité télomérase que cTR et 3 à 4 fois plus que les sous-unités humaine hTR et murine mTR. Par ailleurs, *in vivo* l'infection de poulets par des souches virulentes entraîne une augmentation significative de l'activité télomérase dans les PBL, accompagnée d'une prolifération lymphocytaire intense, alors que l'infection par les souches vaccinales MDV-Rispens et HVT n'entraînent pas d'activation de la télomérase. Ces résultats suggèrent que l'infection par MDV régule positivement l'activité télomérase et que la sous-unité vTR pourrait être un facteur déterminant dans les processus de tumorigénèse viro-induite.

FATAL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* INFECTION IN THE ABSENCE OF MYD88

Fremont Cecile,[†] Michael B. Drennan,^{*} Valerie J.F. Quesniaux,[†] Delphine Nicolle,[†] Nicolas Noulon,[†] Vladimir Yermeev,[†] Lizette Fick^{*}, Muazzam Jacobs^{*} and Bernhard Ryffel.^{2†}

[†] CNRS, GEM2358, Orleans, France

◆ Department of Immunology, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

Mycobacterium tuberculosis (MTB) and mycobacterial cell wall components activate the innate immune system through Toll-Like receptors (TLR). Here we tested whether the MyD88 adaptor protein involved in TLR signalling plays a role in mycobacterial resistance. While primary MyD88^{-/-} macrophages and dendritic cells do not produce TNF, IL12 and NO in response to MTB, CD40, CD86 and class II expression is normally upregulated. In vivo aerosol infection of MyD88^{-/-} mice with MTB (100CFU) is lethal within 4-5 weeks with 3 log higher CFU in the lung and acute, necrotic pneumonia. Heightened sensitivity of MyD88^{-/-} mice is associated with reduced recruitment and activation of CD4 and CD8 T cells and reduced antigen induced T cell proliferation and secretion of IFN γ in response MTB. Finally, using bone marrow chimera we show that normal bone marrow reconstituted MyD88^{-/-} are still susceptible, while wild-type mice reconstituted with MyD88^{-/-} bone marrow remain resistant to MTB infection. Therefore, non-hemopoietic cells are responsible for the increased susceptibility MyD88^{-/-} mice. These data demonstrate that MyD88 expressed on non-hemopoietic cells plays a critical role in the recognition and activation by the pathogen and for the control of adaptive immune response to MTB infection.

GLYCOTARGETING: OLIGONUCLEOTIDE-GLYCOCLUSTER CONJUGATES.

Frison N., Marceau P., Bousser M.T., Duverger E., Mayer R.†, Monsigny M. and Roche A.C.
Glycobiologie-VTI, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans France.
Tél : 02 38 25 55 37, fax : 02 38 25 55 57, méil : roche@cnsr-orleans.fr

In search of specific and highly selective sugar clusters for membrane lectins expressed by dendritic cells, such as the mannose receptor (MR) and DC-SIGN (DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin), various oligosaccharides were converted into glycosynthons (Os). Os were used to synthesize oligolysine-based glycoclusters: Os-[Lys(Os)]_n-Ala-Cys-NH₂, with n = 1 to 5 (1). The glycoclusters used in this work were made from glycosynthons prepared from lactose, dimannosides, Lewis b and a mixture of Lewis a and Lewis x as well as Lewis a and Lewis x isolated as pure compounds upon HPLC of a mixture of the two glycosynthons (2). The glycocluster specificity was assessed by flow cytometry and surface plasmon resonance: dimannoside clusters have a higher affinity for MR than for DC-SIGN, while clusters made with Lewis moieties were better recognized by DC-SIGN and were taken up by cells expressing DC-SIGN.

Oligonucleotide-glycocluster conjugates were synthesized by using phosphorothioate-type oligonucleotide (ODN) labeled on its 3' end with fluorescein isothiocyanate. The tagged ODN was coupled on its 5' end through a disulfide bridge to the cysteiny residue of a glycocluster. Free ODN was very poorly internalized by HeLa cells expressing DC-SIGN whereas the oligonucleotide-glycocluster conjugates containing Lewis moieties were efficiently internalized.

Based on their high specificity and exquisite selectivity, these glycoconjugates have a therapeutic potential.

(1) Frison, N., Marceau, P., Roche, A.C., Monsigny, M., Mayer, R. (2002) Oligolysine-based saccharide clusters: synthesis and specificity. *Biochem J* **368**, 111-9.

(2) Frison, N., Meunier, L., Marceau, P., Quétard, C., Strecker, G., Roche, A.C., Mayer, R. Monsigny, M. (2003) Chromatographic separation of Lewis^a and Lewis^x oligosaccharides as glycosynthons. *Biochimie* **85**, 47-51.

♦ Frison, N., Taylor, M.E., Soilleux, E., Bousser, M.T., Mayer, R., Monsigny, M., Drickamer, K., Roche, A.C. (2003) Oligolysine-based oligosaccharide clusters: selective recognition and endocytosis by the mannose receptor and DC-SIGN. *J. Biol. Chem.* **278**, 23922-9.

This work was supported by grants from Région Centre/Biotechnocentre.

† Sorrowfully, R. Mayer, Research Director at CNRS, passed away on November 2002

P24

PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES DANS DIFFERENTS ORGANES D'*HYPERICUM PERFORATUM* L. REGENERES A PARTIR DE CULTURES *IN VITRO*

Gadzovska Sonja^{1,2}, Kéravis Gérard¹, Maury Stéphane¹, Spasenoski Mirko², Hagège Daniel¹, Joseph Claude¹.

1- LBLGC, Université d'Orléans, UPRES EA 1207, BP 6759, 45067 Orléans cedex 2, France.

2- St. Cyril and Methodius University, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Institute of Biology, box 162, 1000 Skopje, Republic of Macedonia.

Le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.) est une plante utilisée en phytothérapie, notamment dans la lutte contre les dépressions, les infections virales et certains processus inflammatoires. Ses propriétés résulteraient de l'activité de l'hypéricine et de la pseudohypéricine, deux di-anthroquinones polycycliques présentes en faible quantité.

La régénération de plantes à partir d'explants cultivés *in vitro* et acclimatés permet d'obtenir une floraison et une fructification à partir de la 2^{ème} année au champ. Les teneurs en métabolites secondaires (composés phénoliques, flavonoïdes, flavonols, anthocyanines et hypericine) ont été évaluées dans des plants *in vitro* âgés de trois mois avant mise au champ, dans les parties végétatives en fin de première année de végétation, puis, dans les feuilles, les tiges, les fleurs et les fruits de plants âgés de deux ans.

Les résultats obtenus par HPLC-DAD à partir de plants cultivés *in vitro* âgés de trois mois montrent que les métabolites secondaires observés sont chimiquement différents et s'accumulent en plus faibles quantités que dans les plants cultivés *in vivo*. Par exemple, les flavonoïdes trouvés ont un temps de rétention et un spectre UV différents, comparés aux flavonoïdes des plants *in vivo* ou aux standards du commerce. Pour les plants âgés de deux ans, la composition et les quantités observées varient selon l'organe et le type de métabolite secondaire étudié. Ce sont toujours les fleurs qui présentent les teneurs les plus élevées.

Il semble donc que les conditions de culture favorisent la synthèse de certains métabolites secondaires et réprime certains autres. Les plantes obtenues *in vitro* présentent, sur les jeunes feuilles, des glandes analogues à celles observées sur les plantes au champ. La présence de ces glandes est associée à la biosynthèse de l'hypéricine et de la pseudohypéricine. Les cultures *in vitro* de *H. perforatum* L. pourraient être utilisées pour la production de naphthodianthrones, mais également de nouveaux composés présentant un intérêt pharmaceutique. Afin de mieux évaluer le potentiel de production de tels systèmes, il est nécessaire de déterminer les métabolites secondaires non identifiés et de s'assurer de leur réel intérêt économique.

P25

EVIDENCE FOR FUNCTIONAL β_2 -ADRENERGIC RECEPTORS IN GUINEA-PIG HEART MUSCLE

Gannier F. E., M. J. Malécot⁽¹⁾, G. Delaval⁽¹⁾, J. M. Lignon & C. O. Malécot.

CNRS UMR 6542, Physiol. Cellules Cardiaques & Vasculaires, Fac. Sciences, Parc de Grandmont, 37200 Tours (France). Tel : 33 (0)2 47 36 70 09 ; Fax : 33 (0)2 47 36 71 12 ; e-mail : malecot@univ-tours.fr. (1) *contributed equally to the work.*

Although β_2 -adrenergic receptors have been detected by biochemical methods in the guinea-pig heart and represent about 10% of total β -receptors, their functional role is still a matter of controversy. Most of the studies reported in the literature have shown that only β_1 -receptors are involved in the inotropic response to catecholamines due to multiple sites of action, as opposed to the subsarcolemmal localization of the β_2 effects. The aim of our study was to determine (1) the functional existence of β_2 -adrenergic receptors and (2) their potential role in the inotropic state of isolated guinea-pig papillary muscle during general β -adrenergic stimulation with isoprenaline (ISO). The experiments were carried out at 37°C on isolated right papillary muscles stimulated at 2Hz and superfused with a standard bicarbonate-buffered (pH 7.35) Tyrode solution containing 2 mM CaCl₂. Bath application of the β_2 -adrenergic agonist salbutamol (SAL) induced a dose-dependent positive inotropic effect (maximum increase of $+78.9 \pm 18.6$ % ; mean \pm SE, n = 5). The dose-response curve was biphasic with respective EC₅₀ of 5.3 ± 2.2 nM (19.6 % of the maximum response) and 3.6 ± 0.6 μ M. The inotropic responses observed at low and at high concentrations were respectively suppressed by the selective β_2 -antagonist ICI 118,551 (ICI, 0.4 μ M) and by the β_1 -antagonist atenolol (0.8 μ M), thus indicating the existence of functional β_2 -adrenergic receptors in guinea-pig papillary muscle. In order to determine whether these β_2 receptors play a role during general β -adrenergic stimulation, dose-responses curves to ISO were determined in control conditions and in the presence of the β_2 -antagonist ICI (0.4 nM – 0.4 μ M). Surprisingly, in the presence of increasing concentrations of ICI the maximum response to ISO significantly increased (P<0.001) as well as the slope of the dose-response curve (from 1.1 to 2.0), in a dose-dependent manner (0.4 nM : +11 % ; 0.4 μ M : +43 %), without significant effect on the EC₅₀ (~35 nM). These results suggest that, in guinea-pig papillary muscle, β_2 -adrenergic receptors are able, after their activation, to positively or negatively (likely via a dual Gs/Gi protein pathway) modulate the inotropic state, depending on the degree of activation of the β_1 -adrenergic receptors.

P26

IDENTIFICATION DE LA TRYPTASE COMME L'ENZYME DE MATURATION DE LA TRAPPINE-2 EN ELAFINE, UN INHIBITEUR DES PROTEASES A SERINE DE NEUTROPHILES.

Guyot Nicolas, Zani Marie-Louise et Moreau Thierry

Laboratoire d'Enzymologie et Chimie des Protéines, EMI-U 00-10, Protéases et Vectorisation, Faculté de Médecine, Université François Rabelais, 2 bis Bd Tonnellé 37032 TOURS Cedex Tél : 02 47 36 61 77 Fax : 02 47 36 60 46 E-mail : moreaut@univ-tours.fr

L'accumulation excessive de neutrophiles et leur mort cellulaire dans les poumons de patients atteints de pathologies pulmonaires inflammatoires comme la mucoviscidose entraînent le relargage de quantités importantes de protéases à sérine telles que l'élastase, la protéase 3 et la cathepsine G.

Dans le cadre d'une approche thérapeutique anti-inflammatoire visant à limiter les effets délétères de ces trois protéases par administration d'inhibiteurs recombinants sous forme d'aérosol, nous avons exprimé deux inhibiteurs de la famille des chélonianines, l'élafine et son précurseur, la trappine-2 (ou pré-élafine) dans la levure *Pichia pastoris*. La trappine-2 possède en plus de son domaine inhibiteur correspondant à l'élafine (domaine C-terminal), un domaine N-terminal comportant une séquence substrat de transglutaminase qui pourrait permettre un ancrage de la trappine-2 aux protéines de la matrice extracellulaire. L'étude des propriétés de ces deux molécules (1) nous a permis de montrer qu'elles possèdent une capacité inhibitrice similaire vis-à-vis de leurs protéases cibles (élastase et protéase 3). Toutefois, dans les liquides biologiques, on détecte essentiellement la présence d'élafine, laissant supposer qu'elle est libérée à partir de la trappine-2 par protéolyse limitée. Parmi différentes protéases testées, nous avons identifié la tryptase, une protéase à sérine d'origine mastocytaire, comme la seule enzyme capable de libérer rapidement et de manière spécifique l'élafine à partir de son précurseur.

(1) Zani M.L., , Mahmoudi-Nobar S., Lacour S.A., Lemoine S., Boudier C., Bieth J.G. and Moreau T. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Soumis à publication.*

P27

CONSEQUENCES SUR LA FONCTIONNALITE DE L'AXE CORTICOTROPE D'UNE SELECTION GENETIQUE POUR L'IMMOBILITE TONIQUE CHEZ LA CAILLE.

Hazard Dominique, Faure Jean-Michel, Guémené Daniel
Station de Recherches Avicoles, INRA Centre de Tours-Nouzilly 37380 Nouzilly
02 47 42 78 38 (fax : 77 78), hazard@tours.inra.fr

Deux lignées de caille japonaise ont été sélectionnées de façon divergente pour une durée d'immobilité tonique (IT) courte (STI : Short Tonic Immobility) ou longue (LTI : Long Tonic Immobility) (Mills et Faure, 1991). Ces lignées, soumises à une photopériode de 16h, ont été utilisées à l'âge de 6 sem. pour appréhender les conséquences de cette sélection sur la fonctionnalité de l'axe corticotrope.

La réponse en corticostérone (B) induit par le placement dans une boîte de contention est maximale, pour chaque lignée et chaque sexe, après 10 min. de contention. Cette réponse maximale est maintenue lorsque l'on augmente la durée de contention, et est de plus forte amplitude chez les STI quelque soit la durée de contention. Ce dernier constat pourrait impliquer différents mécanismes de régulation au sein de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale entre les deux lignées. Afin de tester si ces différences sont dues à une différence de fonctionnalité surrénalienne, des tests pharmacologiques ont été réalisés avec un analogue agoniste de l'ACTH 1-24 : le synacthène immédiat (SI). La sensibilité de la surrénale ne diffère pas entre les lignées mais la capacité de réponse maximale apparaît plus élevée chez la lignée STI. L'amplitude d'élévation de la corticostéronémie et le délai nécessaire pour que le taux maximal soit atteint est fonction de la dose de SI injectée et est comparable pour les deux lignées.

En conclusion, la sélection génétique pour l'IT a donc bien affecté la fonctionnalité globale de l'axe corticotrope, et en particulier de la surrénale.

Les corticostéronémies mesurées après contention restent significativement inférieures aux taux maximaux résultant de l'injection d'une forte dose de SI. Ces résultats et l'absence de réponse après la contention de cailles LTI âgées de 9 et 12 sem. suggèrent que les différences observées entre lignées ne sont pas uniquement attribuables à la différence de capacité de réponse surrénalienne. Des investigations complémentaires notamment à des niveaux supérieurs (hypothalamus et hypophyse) devront être réalisées afin de poursuivre la caractérisation des causes des divergences fonctionnelles observées entre les lignées.

STRUCTURE / FUNCTION ANALYSIS OF NUCLEAR TARGETING IN EPIDERMAL ONION CELLS TRANSFECTED BY BIOLISTIC OF A BHLH TRANSCRIPTION FACTOR AND THREE MARINER TRANSPOSASES FUSED TO THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN .

Hedhili Sabah (1), Demattéi Marie-Véronique (2), Thiersault Martine (1), Bigot Yves (2), Gantet Pascal (1, Email : gantet@univ-tours.fr)

(1) Unité sous Contrat reconnue par l'INRA « *Facteurs de Transcription et Ingénierie Métabolique Végétale* », EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences et Techniques et faculté de Pharmacie, Parc de Grandmont, 37200 Tours.

(2) Laboratoire d'Etude des Parasites Génétiques, FRE CNRS 2535, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours.

A functional analysis of the domains involved in the nuclear localization of a plant transcription factor (CrMYC2 from *Catharanthus roseus*) and of three *mariner* transposases (MOS 1, HIMAR, MCMAR 1) (1) have been carried out. The cellular localization of complete or truncated proteins fused to GFP have been studied by epifluorescence microscopy in transiently transformed onion epidermal cells. Our data shown that CrMYC2 possess a functional nuclear localization signal (NLS) in N-terminal, and that a motif necessary for the translocation of the protein in the nucleus is located in the C-terminal part of the protein. The central part of the three transposases is not involved in the nuclear translocation. An active NLS is located in the C-terminal part of these proteins. The catalytic C-terminal domain of MCMAR inhibited the nuclear translocation of this protein.

The CrMYC2 transcription factor will be used as a molecular tool to engineer the production of pharmacologically valuable secondary metabolites by plants cells (2) and the Mariner transposase to design an inducible mutational system in plants.

In these aims, data obtained in this study will allow to optimise the nuclear targeting of these proteins in homologous and heterologous biological system.

(1) LEROY H., CASTAGNONE-SERENO P., RENAULT S., AUGÉ-GOUILLOU C., BIGOT Y. and ABAD P. 2003, Characterization of *Mcmar1*, a *mariner*-like element with large ITR from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne chiwoodi*. - **Gene** 304 : 35-41.

(2) GANTET P. and MEMELINK J., 2002, *Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites*, TRENDS in Pharmacological Sciences, 23, 563-569

P29

CARACTERISATION DES ANTICORPS ANTI-ECG, PRODUITS CHEZ LES CHEVRES, LORS DES TRAITEMENTS D'INDUCTION ET DE SYNCHRONISATION DE L'OESTRUS ET DE L'OVULATION.

Hervé Virginie, François Roy, Jean Bertin, Florian Guillou et Marie-Christine Maurel.
Laboratoire Mécanismes d'Action des Gonadotropines, UMR 6073 INRA /CNRS /Université de Tours, Station de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques, 37380 Nouzilly, France. Tel. (33) 2 47 42 79 57 Fax. (33) 2 47 42 77 43 E-mail: herve@tours.inra.fr et maurel@tours.inra.fr.

Chez les chèvres, les traitements associant un progestagène et la gonadotropine chorionique équine (eCG) sont la manière la plus courante pour induire et de synchroniser l'oestrus et l'ovulation, et de permettre l'insémination artificielle (IA) et/ou la reproduction à contre-saison. Lors du premier traitement, l'injection de eCG induit, chez certaines femelles, la production d'anticorps anti-eCG (Ac anti-eCG) qui vont interférer dans l'efficacité des traitements suivants. Ces Ac anti-eCG retardent le pic préovulatoire de LH et l'ovulation, conduisant à une baisse de la fertilité des femelles traitées. L'étude des Ac anti-eCG grâce à des dosages biologiques *in vitro* a montré que ces Ac anti-eCG pouvaient inhiber ou potentialiser les bioactivités LH et/ou FSH de la eCG. L'utilisation du BIAcore a démontré que le niveau de modulation des bioactivités de la eCG ne dépendait pas de l'affinité des Ac anti-eCG pour la eCG. La spécificité des Ac anti-eCG, étudiée par ELISA compétitif, a mis en évidence l'importance de l'environnement glycanique dans le mécanisme de reconnaissance, et plus particulièrement des acides sialiques spécifiques à eCG.

Références bibliographiques :

- 1) Hervé V., Roy F., Bertin J., Guillou F. and Maurel MC Endocrinology, *in press*.
- 2) Roy F, Maurel MC, Combes B, Vaiman D, Cribiu E, Lantier I, Pobel T, Deletang F, Combarous Y, Guillou F.. Biol. Reprod. 1999; 60:805-813.
- 3) Roy F, Combes B, Vaiman D, Cribiu E, Pobel T, Deletang F, Combarous Y, Guillou F, Maurel MC.. Biol Reprod 1999; 61: 209-218.

P30

TRANSCRIPTION AND EXPRESSION OF PLASMID DNA: DEPENDENCE ON POLYETHYLENIMINE OR LACTOSYLATED POLYETHYLENIMINE IN POLYPLEXES

Honore I.¹, S. Grosse¹, N. Frison², F. Favatier¹, M. Monsigny², I. Fajac¹
1. *Physiol. Respir., Faculté Cochin, Paris* 2. *Glycobiologie, CBM-CNRS, Orléans,*

Polyethylenimine (PEI) is an efficient vector for gene transfer into various mammalian cells including airway epithelial cells. We recently developed a lactosylated PEI (Lac-PEI) and showed that Lac-PEI was more efficient than unsubstituted PEI for gene transfer into immortalized cystic fibrosis airway epithelial Σ CFTE29o- cells. The aim of the present work was to evaluate the putative impairment of the transcription and of the expression of a plasmid complexed with either PEI or Lac-PEI (polyplex or glycoplex, respectively). Complexes made of plasmids (5kb or 10 kb) and Lac-PEI or PEI ($M_r \sim 25\ 000$, branched form) had nitrogen/DNA phosphate (N/P) ratios in the 2.5 to 20 range. The size and the zeta potential were determined by using a Zetasizer. The size of complexes made with Lac-PEI or PEI at any $N/P \geq 10$ was around 200 nm. At $N/P \leq 5$, the size could not be accurately determined. The zeta potential of complexes made with Lac-PEI or PEI at an N/P ratio of 10 was strongly positive: + 30 mV and + 40 mV, respectively. The transfection efficiency was measured 24 h after a one hour incubation of Σ CFTE29o- cells in the presence of complexes: the highest luciferase activity was achieved with an N/P ratio of 10 for Lac-PEI ($3.2 \pm 0.8 \cdot 10^8$ RLU/mg of protein) and 5 for PEI ($2.4 \pm 0.4 \cdot 10^8$ RLU/mg of protein). The initiation of transgene transcription was analyzed in an acellular nuclease S1 transcription assay: the transgene transcription was the most efficient at an N/P ratio of 10 but was lower than that observed with the naked plasmid. The nuclear expression of the transgene was assessed in living cells upon an intranuclear microinjection of complexes: the highest expression was observed when the N/P ratio was 10 with both vectors ($90 \pm 4\%$ of GFP-positive cells), close to that of the naked plasmid ($98 \pm 4\%$ of GFP-positive cells). The presence of PEI or of Lac-PEI in a polyplex appeared to be a limiting step of the intranuclear transgene expression, this impairment could be avoided by using modified PEI in order to improve the release of the plasmid.

P31**MESURE ET QUANTIFICATION DES PROTEASES A SERINE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES PAR DE NOUVEAUX SUBSTRATS**

Korkmaz B., Hazouard E., Attucci S., Gauthier F.

INSERM EMI-U 00-10 "Protéases et Vectorisation" ✉ Laboratoire d'Enzymologie et Chimie des Protéines, Université François Rabelais, 2 bis boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex. ☎ 02 47 36 60 49, Fax : 02 47 36 60 36, E-mail : brice.korkmaz@etu.univ-tours.fr

Une thérapie anti-inflammatoire utilisant des antiprotéases pourrait être appliquée à l'ensemble des pathologies inflammatoires pulmonaires comme la mucoviscidose. Au cours de cette pathologie, des quantités massives de protéases à sérine (élastase (HNE), protéase 3 (Pr3) et cathepsine G (cat G)) sont libérées par les polynucléaires neutrophiles au site inflammatoire. Bien que ces trois protéases soient stockées en quantité similaire et libérées simultanément par les neutrophiles, leur concentration sous forme active dans le milieu extérieur peut varier considérablement, en raison de leur attachement plus ou moins étroit à la membrane, de leur sensibilité vis-à-vis des inhibiteurs endogènes ou vis-à-vis d'autres molécules modulant leur activité (ADN, héparine, alginates...). Afin d'étudier le rôle respectif de chacune des trois protéases, nous avons pour la première fois développé des substrats discriminants en exploitant les caractéristiques structurales de leur site actif, particulièrement pour l'élastase et la protéase 3, ces deux protéases ayant une spécificité de substrat très proche. Les substrats que nous avons développés permettent de quantifier chaque protéase dans un milieu biologique complexe. Les résultats préliminaires montrent que les trois protéases sont présentes sous forme active et en concentrations similaires dans les surnageants d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose. Cependant, une part importante de chaque protéase reste emprisonnée dans le culot cellulaire où l'attachement aux membranes les rend moins sensibles au contrôle par les inhibiteurs. L'action combinée d'un détergent non ionique et de la variation de la force ionique, permet de les libérer de façon relativement spécifique. Ces résultats permettront de suivre dans le temps et l'espace l'activité de chaque protéase dans un milieu complexe et de mieux appréhender leur fonction biologique pour une sélection optimale d'inhibiteur(s) développé(s) à des fins thérapeutiques.

Références :

Korkmaz B, Attucci S, Hazouard E, Ferrandière M, Jourdan ML, Brillard-Bourdet M, Juliano L, Gauthier F. (2002). *Discriminating between the activities of human neutrophil elastase and proteinase 3 using serpin-derived fluorogenic substrates.* **J Biol Chem.**, (277), 39074-39081.

P32

QUESTIONS RAISED BY THE USE OF ROLIPRAM, A PHOSPHODIESTERASE INHIBITOR, IN RAT ISOLATED VASCULAR PREPARATIONS

Korkmaz Céline, Maupoil Véronique, Chevalier Stephan* and Freslon Jean-Louis

UMR CNRS 6542 , Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 TOURS, France.

*Pfizer Global R&D, 37401 Amboise, France Tel : 02 47 36 70 09 ; Fax : 02 47 36 71 12 ; e-mail : ckorkmaz@physio-a.univ-tours.fr

Phosphodiesterase (PDE) inhibitors, which increase intracellular levels of cAMP and/or cGMP in various tissues, are drugs of therapeutic interest. In toxicological studies in rats and dogs, vasculitis have been reported, which could be due to their vasodilating properties. In the present study, we started investigating this type of effect *in vitro* with rolipram, an inhibitor of the cAMP-specific isoform of PDE (PDE IV) in rat aorta and also in mesenteric resistance arteries reported to be affected by vasculitis. To this end, aortic rings from male Sprague-Dawley rats were mounted in organ baths and segments of mesenteric arteries (mean diameter $317 \pm 53 \mu\text{m}$) in a Mulvany myograph under normalized tension for measurement of isometric force.

When testing rolipram *in vitro*, two particular conditions must be taken into account : 1) the solvent, either dimethylsulfoxide (DMSO) or ethanol; 2) the delay between addition of the drug in the bath and measurement of the maximal relaxing response, since an intracellular mechanism of action must be considered for this class of drug. When a short period was used between two additions (3 min), the ethanol effect was negligible and rolipram induced an endothelium-dependent relaxation ($EC_{50} = 7.7 \times 10^{-6} \text{ M}$, maximum = $57 \pm 12 \%$ of maximal noradrenaline (NA) contraction). When a longer period was used (15 min), a relaxation was observed with both DMSO and ethanol (ca $60 \pm 7 \%$ of maximal NA-contraction for a concentration of $5 \times 10^{-3} \%$) and rolipram (10^{-6} M) increased this relaxation up to $80 \pm 5 \%$ in the presence of endothelium whereas no modification was observed in absence of endothelium. In mesenteric resistance arteries, DMSO ($5 \times 10^{-3} \%$) induced a relaxation ($39 \pm 2 \%$ of the maximal NA-induced contraction) and rolipram (10^{-6} M) increased this effect up to $59 \pm 1 \%$.

These preliminary results confirm that rolipram could induce a vasorelaxation which appears to be endothelium-dependent. Further experiments are needed to determine the appropriate solvent and the optimal delay for measurement of relaxing responses after additions of rolipram.

P33

CONTROL OF THE INTESTINAL INFECTION BY *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* DOES NOT REQUIRED MESENTERIC LYMPH NODES AND PEYER'S PATCHES.

Lacroix-Lamandé S., Barrier M., Mancassola R. and Laurent F.

Equipe Contrôle et Immunologie des maladies à Protozoaires, UR86 Bioagresseurs, Santé et Environnement, INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France.

Cryptosporidium parvum is a protozoan parasite that infects intestinal epithelial cells and induces a moderate inflammation of the intestine. This opportunistic parasite causes diarrhea in young or immunocompromised hosts suggesting the very strong correlation between the control of infection and the host's immune system efficiency.

No or little information are available concerning the initiation of the specific immune response in the intestine. In this work, by using TNF α /Lt α -/- (Tumor Necrosis Factor-alpha / Lymphotoxin-alpha) and Lt α -/- mice, which are devoid of Peyer's patches (PP) and lymph nodes, we studied the implication of these cytokines and of these lymphoid organs in cryptosporidiosis. We observed that the absence of PP and of mesenteric lymph nodes had no incidence on the development of *C. parvum* infection in adult mice. In contrast, knock-out neonate mice are more heavily infected than wild-type neonate mice but control the infection as efficiently after three weeks. All together, these data show that the presence of PP and of lymph nodes are not necessary for the protective immune response against *C. parvum* infection.

REGULATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE LA CATHEPSINE K : ROLE MAJEUR DE LA POCHE S2

Lecaille Fabien¹, Dieter Brömme² et Gilles Lalmanach¹

¹ INSERM EMI-U 00-10 "Protéases et Vectorisation", Laboratoire d'Enzymologie et Chimie des Protéines, Université François Rabelais, 2 bis Bd Tonnellé, 37032 Tours cedex, France

² Department of Human Genetics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA

Outre leur rôle dans la dégradation des protéines internalisées ou la présentation à l'antigène, les cathepsines lysosomales B, L, S, K ou apparentées interviennent aussi dans des pathologies infectieuses (invasion de l'hôte par des bactéries ou des parasites) ou cancéreuses (prolifération métastatique) ainsi que lors de réactions inflammatoires (asthme, emphysème, arthrose) (Lecaille et al., 2002a). Parmi les différentes cathepsines, la cathepsine K a été identifiée et caractérisée principalement dans des cellules osseuses humaines et représente une cible potentielle dans le traitement des maladies osseuses comme l'ostéoporose. L'expression de cette protéase à cystéine (CP) majoritairement présente dans les ostéoclastes est fortement augmentée dans de nombreux types cellulaires lors d'inflammation. En outre la cathepsine K présente une activité collagénolytique (vis à vis de la triple hélice du collagène de type I qui est le constituant majeur de la matrice osseuse) unique parmi les protéases à cystéine. Le site de clivage préférentiel s'opère après le motif G-P-X (X= Proline or hydroxyproline) avec en position P2 une Proline et P3 une Glycine. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, nous avons modifié par mutagenèse dirigée le sous site S2 (déterminant majeur de la spécificité des CPs) du site catalytique de la cathepsine K et nous l'avons remplacés par celui de la cathepsine L (Lecaille et al., 2002b). Après caractérisation de la spécificité enzymatique de ce mutant Y67L/L205A par une banque de substrats fluorogéniques, nous avons testé son aptitude à cliver le collagène de type I. Comme la cathepsine L, le mutant Y67L/L205A est dépourvu de toute activité collagénolytique mais conserve sa propriété gélatinolytique.

D'autre part, des études préalables ont montré que la spécificité de la cathepsine K à accepter une proline dans la poche S2 est similaire avec celle de la congopaine qui est une protéase à cystéine parasitaire issue de *Trypanosoma congolense*. Du fait de leur étroite identité dans leur séquence primaire et structurale, le substrat Abz-HPGGPQ-EDDnp préalablement développé pour la congopaine (Serveau et al., 1999) a été testé vis à vis de la cathepsine K. Les résultats montrent que ce substrat fluorogénique est clivé spécifiquement par la cathepsine K (site de clivage entre G-G) et non par les autres cathepsines B, H, L, F, S et V. De plus nous avons montré *ex vivo* que le substrat Abz-HPGGPQ-EDDnp est également hydrolysé uniquement par la cathepsine K dans des lysats cellulaires de fibroblastes de souris sauvages et non dans des modèles déficients en cathepsine K.

Références :

- a) F. Lecaille, J. Kaleta & D. Brömme. Human and parasitic papain-like cysteine proteases : their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. (2002) *Chem. Reviews* 102, 4459-4488.
- b) F. Lecaille, Y. Choe, W. Brandt, Z. Li, C.S. Craik & D. Brömme Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. (2002) *Biochemistry* 41, 8447-54.
- c) Serveau, G., I. Lalmanach, J. Scharfstein, M. A. Juliano & F. Gauthier. Discrimination of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, and mammalian cathepsins B and L, by a pH-inducible fluorogenic substrate of trypanosomal cysteine proteinases. (1999) *Eur. J. Biochem.* 259, 275-280.

P35

TRANSFERRINE ET FONCTION TESTICULAIRE

Lécureuil Charlotte, Fontaine Isabelle, Guillou Florian
UMR 6073 INRA-CNRS-Univ. Tours, PRC, Equipe "Mécanisme d'action des Gonadotropines", 37380 Nouzilly – lecureui@tours.inra.fr

La transferrine (Tf) est une glycoprotéine monomérique présente dans les fluides biologiques, qui a la propriété de lier le fer de façon réversible. Dès sa synthèse par le foie, la Tf est rapidement sécrétée, délivrant le fer aux autres organes et tissus utilisateurs. Cependant, elle ne peut remplir cette fonction auprès des organes isolés du flux sanguin par des barrières hématiques comme le testicule et le Système Nerveux Central (SNC). Ces organes, doivent synthétiser eux-mêmes la Tf. Au sein du testicule, ce sont les cellules de Sertoli impliquées dans le contrôle de la spermatogénèse, qui synthétisent la Tf. La Tf est un marqueur important de l'intégrité du fonctionnement sertolien. En vue d'analyser son rôle physiologique dans le fonctionnement testiculaire, des souris exprimant le gène de la Tf humaine ont été réalisées.

Nous avons recherché l'expression de la Tf humaine et analysé les conséquences physiologiques de cette expression. Ces souris qui sur-expriment la Tf présentent un retard de croissance, comblé à l'âge de 3,3 mois. Le poids testiculaire de ces animaux âgés de 5 mois est inférieur à celui des animaux sauvages (aucune différence entre les poids épидидymaires) et le nombre de spermatozoïde épидидymaire est également réduit. Néanmoins malgré une baisse de spermatozoïdes épидидymaires allant jusqu'à 50% chez les animaux homozygotes, ils sont parfaitement fertiles.

Grâce à cette lignée de souris, nous avons également analysé la régulation du gène de la Tf humaine par des effecteurs physiologiques de la cellule de Sertoli. Nous avons ainsi démontré que la sécrétion de Tf humaine était stimulée par la FSH, l'insuline, la testostérone, le rétinol et le TNF α . Les effets de la FSH sont mimés par le db-AMPC et la forskoline. Nos résultats démontrent ainsi que les séquences introduites (73,5kb) du gène de la Tf humaine permettent la régulation par les mêmes effecteurs que le gène de la Tf murine.

En conclusion, grâce à ce modèle de souris nous avons pu établir qu'une sur-exprimant de Tf est délétère pour la spermatogénèse. Nous espérons maintenant réaliser une invalidation ciblée dans les cellules de Sertoli du gène de la Tf afin de compléter nos données sur le rôle physiologique de la Tf.

P36

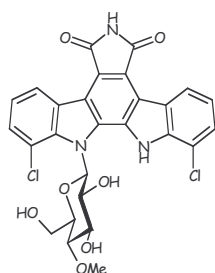
SYNTHESE DE 5-AZAINDOLOCARBAZOLES

Lefoix Myriam ^a, Sylvain Routier ^a, Jean-Yves Mérour ^a, Gérard Coudert ^a, Alain Pierré ^b, Daniel-Henri Caignard ^c, Pierre Renard ^c

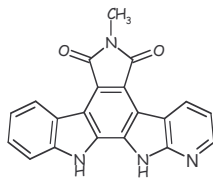
^aInstitut de Chimie Organique et Analytique, associé au CNRS, Université d'Orléans, B.P. 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France, tel :02.38.49.45.76, fax :02.38.41.72.81 ; ^b Institut de Recherches SERVIER, 11 rue des moulineaux, 92415 Courbevoie, France ; ^cLes Laboratoires SERVIER, 1 rue Carle Hebert 92415 Courbevoie Cedex, France.

e-mail : myriam.lefoix@univ-orleans.fr,

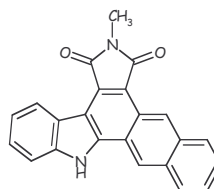
Les indolocarbazoles constituent une vaste famille de composés hétérocycliques qui font l'objet de très nombreux travaux du fait de l'étendue de leurs activités biologiques, en particulier, de leurs propriétés antitumorales¹. La rébeccamycine **1** est un produit naturel, isolé de microorganismes, représentatif de cette série. De nombreuses pharmacomodulations ont été réalisées sur ces dérivés. Pour notre part, nous avons préparé les molécules **2** et **3** dans lesquelles une sous-structure indolique est remplacée soit par un cycle 7-azaindolique² soit par un motif naphthalénique³.



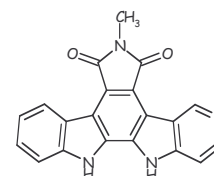
Rebeccamycine **1**



7-azaindolocarbazole **2**



naphtocarbazole **3**



5-azaindolocarbazole **4**

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse des 5-azaindolocarbazoles **4** afin d'évaluer l'influence de la position de l'azote sur l'activité biologique.

- 1 Merlic C.A. ; You Y. ; McInnes D.M.; Zechman A.L.; Miller M;M Deng Q. *Tetrahedron* **2001**, 57, 5199-5212.
- 2 Routier S.; Ayerbe N. ; Mérour J.Y. ; Coudert G. ; Bailly C. ; Pierré A. ; Pfeiffer B. ; Caignard D.H. ; Renard P. *Tetrahedron* **2002**, 58, 6621-6630.
- 3 Routier S. ; Coudert G. ; Mérour J.Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7025-7028.

P37

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE PAR LIGATION CHIMIQUE D'UN MIMÈ
CONCEPTION ET SYNTHÈSE PAR LIGATION CHIMIQUE D'UN MIMÈ DE LA
PROTEINE CARGO TRANSMEMBRANAIRE P23**

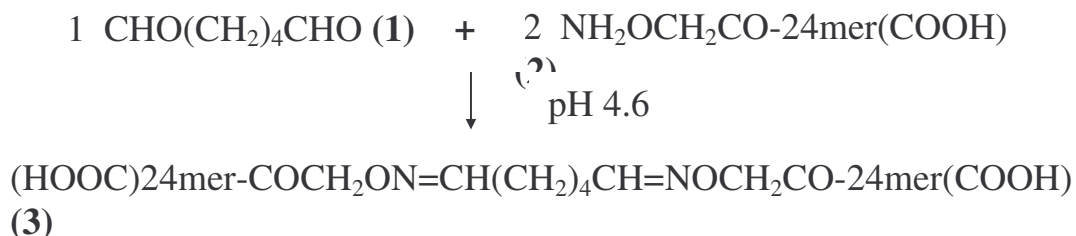
Dominique Lelièvre^{1*}, Cyril Favard², Bruno Antony², Marc Chabre² and Agnès Delmas¹.

¹Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS UPR 4301), rue Charles Sadron, 45071 Orléans

²Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS UMR 6097) 660 route des lucioles, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis,

Les protéines du manteau COPI et COPII sont des polymères qui s'assemblent à la surface des membranes intracellulaires et les déforment pour produire des vésicules de transport à partir respectivement de l'appareil de Golgi et du Reticulum Endoplasmique. Les protéines destinées à être transportées (cargo) sont transmembranaires, elles sont concentrées dans les vésicules COP grâce à de courtes séquences cytoplasmiques comme par exemple un motif dibasique C-terminal (Sohn et al. 1996). Comment ces motifs, souvent multimérisés, interagissent avec les manteaux et quels sont leurs effets sur ceux-ci? Notre objectif est de synthétiser des molécules mimant l'extrémité cytoplasmique de protéines transportées, de les incorporer dans les liposomes et de mesurer leurs effets sur la dynamique des manteaux.

Nous avons imaginé la synthèse d'une molécule originale associant en dimère une partie du segment transmembranaire et l'ensemble de la queue cytoplasmique (24mer) de la protéine cargo p23, composant majeur des vésicules COPI. Pour éviter la présence de groupement NH non engagés dans des liaisons hydrogènes, les trois premiers acides aminés situés du côté N-terminal sont N-méthylés. Le point clé de notre approche consiste à dimériser la molécule par ligation chimique via un linker bifonctionnel hydrophobe. Le choix du linker s'est porté sur un dialdéhyde qui permet de dimériser avec formation de liaisons oxime.



Le dialdéhyde (1) a été directement obtenu, par un traitement acide, à partir du 1,1,6,6-tetraméthoxyhexane commercialisé. Malgré la présence de trois MeLeu, le peptide (2) a été synthétisé sur support solide avec un bon rendement grâce à l'utilisation de l'HATU comme agent de couplage. Les deux liaisons oximes ont été obtenues simultanément à partir du peptide (2) brut. La chimère a été purifiée par HPLC et caractérisée par ES/MS.

Référence

K Sohn., L Orci., M Ravazzola., M Amherdt., M Bremser., F Lottspeich., K Fiedler., JB Helms., FT Wieland, *J Cell Biol.*, 1996, **135**,1239-48.

Correspondance : lelievre@cnrs-orleans.fr

P38

LE SERVICE D'IMAGERIE DU CDTA DU CNRS D'ORLEANS : UNE PLATE FORME TECHNOLOGIQUE DEDIEE A L'EXPLORATION FONCTIONNELLE ET AU PHENOTYPAGE DES RONGEURS TRANSGENIQUES

Lerondel S¹, Le Mée M¹, Le Pape A².

¹**CDTA-CNRS, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cédex**

²*INSERM EMI-U 00-10, Faculté de Médecine, 37032 Tours Cédex*

Le Service d'Imagerie du CDTA a pour missions d'assurer les besoins de la communauté scientifique pour le phénotypage et l'exploration fonctionnelle de rongeurs sous statut sanitaire contrôlé (transgéniques ou mutants, infectiologie, thérapie génique). Il est exploité sous Programme d'Assurance Qualité avec des Procédures Opératoires Standardisées.

Les modalités d'imagerie proposées comprennent :

- Radiologie à haute résolution (100µm) avec caméra CCD et imagerie numérique à haut débit par écrans radiosensibles (résolution 200µm, 10 animaux/heure).
- Ostéodensitométrie par méthode DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry).
- Imagerie radioisotopique in vivo (scintigraphie) à haute résolution avec les radioisotopes émetteurs gamma usuels : Technétium 99m, Indium 111, Iode 123. Possibilité d'explorations par radioisotopes à vie courte ou applications spécifiques en partenariat avec le Centre d'Etudes et de Recherche par Irradiation, Cyclotron-CERI CNRS.
- Imagerie de bioluminescence avec caméra CCD refroidie.

Une **exploitation multi-modalités** de ces techniques d'imagerie est possible avec recadrage / superposition d'images chez le même animal.

Le Service d'Imagerie propose des examens selon des procédures validées pour les organes suivants à partir du 15^{ème} jour chez la souris et le rat :

- squelette : imagerie X à haute résolution (dès la naissance), ostéodensitométrie, scintigraphie du métabolisme osseux (balance ostéolyse-ostéogénèse).
- reins : angiographie, urographie, exploration scintigraphique des fonctions glomérulaires et tubulaires.
- poumons : imagerie X à haute résolution, scintigraphie de la perfusion, imagerie de dépôt d'aérosols.
- appareil digestif : imagerie du transit après injection d'agents de contraste.
- foie : scintigraphie des fonctions phagocytaire et biliaire.

Explorations spécifiques par scintigraphie :

- imagerie scintigraphique de ciblage et de vectorisation (molécules, vecteurs et gènes).
- domiciliation des cellules immuno-compétentes.
- imagerie du recrutement, phagocytose et apoptose des macrophages.
- distribution in vivo de microorganismes.
- biodistribution et pharmacocinétique.

Imagerie de l'expression génique par bioluminescence :

- thérapie génique, thérapie cellulaire.
- cancérologie.
- infectiologie.

Partenariat : projet régional Orléans-Tours d'imagerie par Tomographie d'Emission de Positons : Cyclotron CERI – Laboratoire d'IRM du petit animal CBM CNRS - Polytech'Orléans - IFR n°120 - INSERM EMI-U 0010 Tours.

REVERSAL OF ISOPROTERENOL EFFECTS ON THE ELECTROCARDIOGRAM (ECG) OF MICE BY CARBACHOL: FUNCTIONAL EVIDENCE FOR THE EXPRESSION OF HUMAN GIRK2 SUBUNIT OF K_{ACH} CHANNEL IN FVB/TG84 MICE.

Lignon J.M., Z. Bichler^(*), F.E. Gannier, P. Cosnay, D. Migliore-Samour^(*) & C.O. Malécot. CNRS UMR 6542, Faculté des Sciences, Parc de Grandmont, F-37200 Tours & ^(*) CNRS FRE 2358, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orléans. Tel: 02 47-36-71-13; Fax: 02 47-36-71-12; e-mail: lignon@univ-tours.fr

We investigated the effect of isoproterenol (ISO) injections on ECG and its reversal by the injection of carbachol (CCh) in Swiss, FVB/N and FVB/Tg84 mice. Mice anaesthetised with urethane (1.33 mg/g i.p.) maintained a heart rate (HR) close to that of awake mice (600 to 750 bpm). D1 and D2 ECG derivations (bandwidth 1Hz-10 kHz) were continuously recorded for one hour before the first i.p. injection of ISO 0.3 μ g/kg. ISO was then increased every 20-30 min on a $\frac{1}{2}$ log scale unit up to 1 mg/kg. CCh was then injected i.p. at 5 μ g/kg and the dose was increased on a $\frac{1}{2}$ log scale unit schedule. Swiss and FVB mice show typical murine ECG: following the P wave, large R and S waves are immediately followed by a positive J (Osborne like) wave [Yan & Antzelevitch. 1996. *Circulation*. **93**; 372] that decays away down to a small negative T wave (Tneg) smoothly joining the isoelectric line. ISO had small and transient effects on the ECG waves from 3 μ g/kg and induced large steady state effects at 0.3 and 1 mg/kg. At these doses HR also decreased by about 50 bpm but most obvious effects were on J and T waves. In Swiss mice (n=5) ISO directly pulled down the J wave to negative values unmasking a J point that was followed by a large undershooting Tneg wave. However, in FVB mice (n=8) and at low doses, ISO first induced the development of a delayed long-lasting positive T wave (Tpos). At higher doses, the J and Tneg waves were pulled down and a negative J point developed followed by a large undershooting Tneg and a shortened Tpos. All these effects were blocked by propranolol (2 mg/kg). CCh injections completely abolished the effects of ISO on the ECG waves in Swiss and FVB/N mice with a threshold dose of 50 μ g/kg. However, in FVB/Tg84 mice, total reversal of ISO effects were obtained at a ten times lower dose (5 μ g/kg, n=3). This increased sensitivity to CCh could be accounted for by an over-expression of myocardial GIRK2 subunits of the K_{ACH} channel in these FVB/Tg84 mice which incorporate the human KCNJ6 gene coding for the GIRK2 subunit, as shown by RT-PCR.

P40

UNE NOUVELLE SERIE DE MUTANTS ALLELIQUES AFFECTANT LA VOIE DE SIGNALISATION DE KIT IMPLIQUEE DANS LE MAINTIEN DES CELLULES SOUCHES CHEZ LA SOURIS

Magnol Laetitia, Leroux Stéphanie, Petit Joëlle, Fuchs Helmut♦, Hrabe de Angelis Martin♦, Puech Anne* et Hérault Yann

Laboratoire de Génétique Expérimentale et Moléculaire, CNRS-LGEM, FRE2358

Institut de Transgénése, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2

Tel : 02 38 25 79 30 Fax : 02 38 25 79 30, mèl : magnol@cnrs-orleans.fr

♦ Institute of Experimental Genetics, GSF-National Research Center for Environment and Health, Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Neuherberg, Germany

* Centre National de Génotypage, 2 rue Gaston Crémieux CP 5721, 91057 Evry Cedex, France

Nous avons étudié trois mutations *Sco1*, *Sco5* et *Sow3* affectant la couleur du pelage des souris dans le cadre du programme européen EUROcomp. Ces mutations ont été générées par mutagenèse chimique aléatoire par l'ethyl-nitro-urée dans le génome de la souris. Grâce à une étude génétique nous avons pu démontré que ces trois mutations interféraient entre elles et également avec la voie de signalisation de KIT. Après analyses nous avons démontré que ces mutations présentent un caractère semi-dominant et induisent des phénotypes plus prononcés chez les homozygotes. D'une manière surprenante l'étendue des phénotypes observés diffère suivant les compartiments de maintien des cellules souches pour chacune des mutations. Ainsi chez les individus homozygotes, la mutation *Sco5* affecte à la fois la pigmentation et l'hématopoïèse, alors que *Sco1* affecte uniquement la pigmentation et que *Sow3* conduit à une stérilité associé à un défaut de la spermatogenèse. Une analyse par cartographie génétique suivie d'une approche de gène candidat nous a conduit à localiser puis à identifier des mutations ponctuelles dans la phase codante du gène *Kit* pour les deux mutants *Sco5* et *Sco1*. Une analyse similaire de *Sow3* suggère que cette mutation affecte la régulation de la transcription *Kit*. Les trois mutations *Sco1*, *Sco5* et *Sow3* correspondent une série allélique du gène *Kit* dont l'étude permet de mieux comprendre la fonction du produit de Kit dans les processus de maintien des cellules souches dans différents compartiments cellulaires chez la souris.

P41

LES MACROPHAGES INTRAVASCULAIRES PULMONAIRES (MIVP) : CARACTERISATION ET IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES D'UNE POPULATION CELLULAIRE ATYPIQUE.

O. Ndoye⁽¹⁾, S. Le Guellec - Massuard⁽¹⁾, S. Bernard⁽³⁾, S. Lerondel^(2,4), J. Payer⁽⁴⁾, P. Diot⁽¹⁾, A. Le Pape^(1,2).

⁽¹⁾ Inserm Emi U 0010, Tours, lepape@med.univ-tours.fr, ⁽²⁾ Biopharmconsulting-ARAIR, Tours - ⁽³⁾ INRA Nouzilly ; Tours - ⁽⁴⁾ CNRS-CDTA, Orléans.

Introduction : Certaines espèces animales (porc, mouton) manifestent une sensibilité accrue aux infections pulmonaires et développent des chocs cardiopulmonaires suite à l'injection IV de colloïdes phagocytibles. Cette sensibilité est attribuée à la présence naturelle d'une population cellulaire atypique au niveau des capillaires pulmonaires : les MIVP. Chez l'homme, des images scintigraphiques pulmonaires ont été rapportées lors de certaines hépatopathies, évoquant une induction de ces cellules et incitant à prendre en compte des risques potentiels d'intolérance. L'induction des MIVP a été explorée chez le rat cirrhotique par scintigraphie et examens histologiques via l'injection IV de microsphères fluorescentes et radiomarquées pour comparer le trafic pulmonaire des MIVP induits (rat) et des MIVP naturels (mouton).

Méthodes : Scintigraphies : (i) de phagocytose pour l'étude du recrutement des MIVP chez 30 rats cirrhotiques, et la mise en évidence des MIVP naturels chez le mouton. (ii) de perfusion au ^{81m}Kr, après injection de liposomes en IV (évaluation des conséquences hémodynamiques pulmonaires sur les espèces à MIVP induits). **Examens histologiques :** Coupes de poumon (6µm) examinées en microscopie à fluorescence après injection de 2 pulses (séparées de 10 min à 30 jours) de microsphères vertes ou rouges, chez les rats cirrhotiques et les moutons.

Résultats - Conclusion : les scintigraphies (i) confirment la présence des MIVP naturels chez le mouton et précisent la cinétique d'induction des MIVP chez le rat ; (ii) valident la vasoréactivité pulmonaire médiée par la phagocytose des MIVP induits. L'histologie documente dans les deux modèles le trafic pulmonaire des MIVP depuis l'endothélium des capillaires jusqu'à la lumière alvéolaire et met en évidence chez le rat un ancrage des MIVP persistant au moins 25 jours dans les artéioles. Ces résultats suggèrent que des manifestations inflammatoires chroniques pulmonaires et un risque potentiel de choc hémodynamique à l'injection IV d'agents phagocytibles sont à prendre en compte pour les pathologies entraînant une induction des MIVP.

E. Miot-Noirault, L. Faure, Y. Guichard, J. Montharu and A. Le Pape - Scintigraphy in vivo assesment of the development of Pulmonary Intravascular Macrophage in liver disease. Chest, 2001, 120 : 941-7.

P42

VECTEURS MAGNETIQUES D'ANTICANCEREUX : SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES COMPOSITES D'OXYDES DE FER ET DE POLYMERE BIODEGRADABLE.

Lazare Ngaboni Okassa,^{a,b} Hervé Marchais,^{a*} Laurence Douziech Eyrolles,^b Simone Cohen-Jonathan,^b Martin Soucé,^b Igor Chourpa,^b Pierre Dubois.^b

^aLaboratoire de Pharmacotechnie, ^bLaboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, 31 av. Monge, 37200 Tours.

Ce travail a pour objectif l'obtention de vecteurs magnétiques à base d'oxydes de fer, favorisant le guidage d'agents anticancéreux vers des sites tumoraux, après administration intra-veineuse. Ces oxydes de fer superparamagnétiques sont incorporés dans une matrice polymère afin de limiter leur élimination par le système des phagocytes mononucléés.

Les oxydes de fer, magnétite (Fe_3O_4) et maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sont obtenus sous forme de nanoparticules en suspension aqueuse, communément appelées ferrofluides ioniques. Leur synthèse est réalisée par co-précipitation des oxydes à partir de sels ferreux et ferriques en milieu alcalin, suivie d'une redispersion en milieu aqueux (1).

L'inclusion de ces nanoparticules d'oxydes de fer dans la matrice polymère [poly(ϵ -caprolactone)] est réalisée par une technique de nanoprécipitation (2) aboutissant à la formation de nanoparticules composites d'oxydes de fer et du polymère. Leur taille et morphologie ont été déterminées par granulométrie laser et microscopie électronique. La nature des différents constituants a été analysée par spectrométrie infra-rouge et Raman. Nous avons étudié l'influence des paramètres de formulation sur l'efficacité d'inclusion grâce au dosage du fer en spectrophotométrie d'absorption atomique.

D'après nos résultats, les nanoparticules synthétisées présentent des caractéristiques intéressantes pour une application thérapeutique, bien que le protocole utilisé ne permette pas d'obtenir de forte teneur d'oxydes de fer dans la matrice de poly(ϵ -caprolactone). Afin d'améliorer l'efficacité d'incorporation de ces oxydes, nous envisageons d'étudier d'autres procédés de formulation.

1. Massart R. IEEE Transactions on magnetics. (1981) **17** , 2 , 1247-1248.
2. Fessi, H. . Devissaguet J-P, Puisieux F, and Thies. C., (1992), US Patent No. 5 118 528.

P43

HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER DOMAIN EXTINCTION BY RNA INTERFERENCE SUPPRESSES A CYTOKININ SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY IN *CATHARANTHUS ROSEUS* SUSPENSION CELLS.

Papon Nicolas^a, Amerin Vansiri^a, Jennifer Bremer, Jean-Claude Chénieux, Pascal Gantet^a, Marc Rideau, Joël Crèche^{a,*}.

EA 2106, Plant Molecular Biology and Biochemistry Department, Faculty of Pharmacy, 31 avenue Monge, F-37200 Tours, France.

^a *Unité sous Contrat INRA-Université "Facteurs de transcription et ingénierie métabolique végétale"*

Protein phosphorylation plays crucial roles in regulating many cellular processes such as signal transduction. Multi-step phosphorelays involve a phosphorylation cascade between three types of proteins, namely an histidine kinase (HK) receptor, an histidine-containing phosphotransfer protein (HPt) and a response regulator (RR) [1]. Multi-step phosphorelay transduction modules have been identified to be involved in plant hormone signalisation and recent works showed a four-step phosphorelay to be crucial for cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* [2].

In plants, cytokinins have pleiotropic effects, including the control of the secondary metabolism. In *Catharanthus roseus* cell suspensions, *trans*-zeatin stimulates the biosynthesis of several monoterpenoid indole alkaloid (MIAs) [3]. Indeed, we cloned cDNAs encoding components of multistep phosphorelay putatively involved in cytokinin signalling : *CrCKR1* as an hybrid HK [4] representing a cytokinin receptor, *CrHPt1* as an HPt domain, *CrRR5* as a RRB transcription factor. Furthermore, we recently demonstrated that treating *Catharanthus roseus* cell cultures with cytokinin (CK) was previously proven to induce the transcription of *CrRR1*, a gene encoding a type-A response regulator, within 1 hour [5].

In the present study, we characterised the *CrHPt1* gene that encodes a endogenous histidine-phosphotransfer domain, then we used RNA interference (RNAi) to silence *CrHPt1*. In isolated lines stably transformed by particle bombardment with an intron-spliced construct, the expression of *CrHPt1* was fully suppressed and the CK inductive effect on *CrRR1* was deeply reduced. These results confirmed the essential role of HPt proteins in the CK signalling leading to the expression of the genes encoding type-A response regulators. They also show that RNAi is a powerful strategy to disrupt gene expression in CK signalling pathway.

[1] Loomis *et al.* (1997) *J. Cell Sci.* **110** : 1141-1145.

[2] Hwang and Sheen (2001) *Nature.* **413** : 383-389.

[3] Décendit *et al.* (1992) *Plant Cell Rep.* **11** : 400-403.

[4] Papon *et al.* (2002) *J. Exp. Bot.*, **53** : 1989-1990.

[5] Papon *et al.* (2003) *FEBS Lett.*, **537** : 101-105.

ANALYSE STRUCTURALE PAR CRISTALLOGRAPHIE DE L'INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE UN ENZYME DE REPARATION DE L'ADN (FPG) ET UNE MOLECULE D'ADN ENDOMMAGEE .

Pereira de Jésus Karine, Laurence Serre, Charles Zewer et Bertrand Castaing

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02

La protéine Fpg (Formamidopyrimidine-ADN glycosylase) est une ADN glycosylase du système de réparation de l'ADN par excision de base, spécifique de l'élimination des purines oxydées dans l'ADN : les purines à cycle imidazole ouvert (résidus formamidopyrimidiques, Fapy) capables de bloquer la réplication de l'ADN et l'un des produits majeurs d'oxydation des purines, la 8-oxoguanine (8-oxoG), lésion mutagène car l'ADN polymérase incorpore indifféremment un G ou un A en face de la 8-oxoG (les mutants « nuls » *fpg⁻* sont caractérisés par le phénotype mutateur G→T). En plus de son activité Fapy- et 8-oxoG-ADN glycosylase (clivage du lien *N*-glycosidique entre la base endommagée et le désoxyribose qui lui est associé), Fpg est associée à une activité AP lyase consistant au clivage en 3' puis en 5' du site AP (site abasique apurinique ou apyrimidique lui même pouvant être mutagène ou létal) résultant de son activité ADN glycosylase et conduisant ainsi à une lacune de 1 nucléoside.

Cette affiche présente une analyse structurale par cristallographie d'un complexe entre Fpg et une molécule d'ADN contenant un analogue de site AP. Ces modèles structuraux mettent en évidence les déterminants structuraux et/ou fonctionnels de l'ADN endommagé nécessaires à une interaction spécifique avec l'enzyme. Ils montrent en particulier que : (i) Fpg induit une forte courbure de l'ADN (60°) au niveau du nucléoside endommagé en intercalant 3 résidus d'acide aminé, (ii) le nucléoside endommagé est extrait de la double hélice et stabilisé en position extra-hélicale dans une poche du site actif où il se trouve ainsi exposé pour la catalyse et, (iii) la base opposée à la lésion est reconnue spécifiquement par Fpg et maintenue en position intra-hélicale évitant ainsi un effondrement local de la double hélice au niveau de la lésion.

P45**MORT PAR APOPTOSE D'ASTROCYTES EN CULTURE**

Picard Mélanie et Tobias Hévor

Laboratoire de Métabolisme Cérébral et Neuropathologies – U.P.R.E.S. E.A. 2633

Université d'Orléans. B.P. 6759 F-45067 Orléans Cedex 2 (France).

Téléphone : (33) 02 38 49 49 78 ou (33) 02 38 41 70 96. E-mail : tobias.hevor@univ-orleans.fr

Dans le système nerveux central, les astrocytes protègent les neurones contre plusieurs types d'agressions. Ces astrocytes possèdent un certain nombre de dispositifs leur permettant de jouer ce rôle. Toutefois, les astrocytes eux-mêmes sont sujets à ces mêmes agressions et subissent divers dommages qui ne sont pas bien connus. Dans le présent travail, nous proposons de rechercher l'effet d'une molécule toxique capable de générer les radicaux libres sur la viabilité des astrocytes en culture.

Des cultures d'astrocytes ont été soumises à l'eau oxygénée, substance qui induit un stress oxydatif conduisant à la mort cellulaire. L'état physique de l'ADN nucléaire a été étudié en soumettant les cellules à des agents intercalants fluorescents. L'éventuelle fragmentation de l'ADN nucléaire a été étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose. La libération de lactate déshydrogénase dans le milieu de culture a été évaluée. Le taux de glycogène intracellulaire a été mesuré par spectrophotométrie. Les astrocytes ont été soumis à trois différentes concentrations d' H_2O_2 (100, 200 et 500 μmol) pendant une heure. Puis, ils ont été remis dans un milieu normal sans H_2O_2 pendant 24, 48 ou 72 heures.

Aux fortes concentrations, les noyaux des cellules deviennent pycnotiques. Lorsque les astrocytes sont traités avec le fluorochrome Hoechst 33258, une condensation de l'ADN est observée. Le nombre de cellules à noyaux condensés dépend de la concentration en eau oxygénée. Le taux de lactate déshydrogénase libéré par les cellules dans le milieu augmente avec la concentration en H_2O_2 . Le taux de glycogène intracellulaire augmentent aussi sous l'effet de H_2O_2 . La migration de l'ADN sur gel d'agarose ne présentent pas de fragmentation en échelle caractéristique de l'apoptose, mais, un continuum de taches caractéristiques de la nécrose.

La plupart des résultats indiquent que l' H_2O_2 induit un phénomène apoptotique, mis à part le profil de migration électrophorétique de l'ADN nucléaire. Des expériences complémentaires permettront d'approfondir les mécanismes d'action de l' H_2O_2 sur l'engagement de la cellule dans le processus apoptotique ou nécrotique. Néanmoins, la convergence de nos observations permet, dès maintenant, de penser que les astrocytes eux-mêmes sont sujets à une dégénérescence sous l'effet de stress oxydatif. Ce stress induit une apoptose qui semble être décalée dans le temps et moins importante que l'apoptose neuronale.

P46

**CHIP ET MACROPUCES A ADN :
DEUX OUTILS POUR LA RECHERCHE DES CIBLES DE DSP1.**

Rappailles Aurélien, Decoville Martine, Landemarre Ludovic* et Locker Daniel.
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2
Unité propre de recherche (n°4301) du CNRS conventionnée avec l'Université d'Orléans.
Tel 02 38 25 55 39, e-mail rapaille@cnrs-orleans.fr. *Agro-Bio "La Chavannerie", Rue
D.Papin, 45240 La Ferté St Aubin.

La protéine DSP1 de *Drosophila melanogaster* est une protéine à boîte HMG capable de se fixer à l'ADN sans spécificité de séquence. Il a été montré au laboratoire par des études d'interactions génétiques et des expériences de digestion à la DNase I que DSP1 est un facteur de remodelage de la chromatine. Il agit suivant le locus considéré en synergie avec les protéines des groupes *Polycomb-G* ou *trithorax-G* afin de réguler l'expression d'un certain nombre de gènes et notamment celle des gènes homéotiques regroupés dans les complexes *Antennapedia-C* et *Bithorax-C*.

Dans le but de déterminer les séquences cibles de la protéine DSP1 sur les 300 kb du complexe *Bithorax-C*, nous avons utilisé la technique ChIP (Immunoprécipitation de la chromatine pontée) sur des embryons de Drosophile. Cette technique consiste à lier de façon covalente *in vivo* les protéines à l'ADN, puis à immunoprécipiter la chromatine pontée par un anticorps dirigé contre une protéine donnée. L'ADN immunoprécipité a été analysé à l'aide de macropuces à ADN. Celles ci présentent l'avantage de pouvoir cribler rapidement les 300 kb du complexe *Bithorax-C* avec une résolution de 1000 pb. Les résultats obtenus au laboratoire montrent que la protéine DSP1 est présente sur plusieurs domaines de régulation du complexe *Bithorax-C* parmi lesquels 5 sites sont des cibles prédominantes. Actuellement nous vérifions *in vivo* à l'aide de lignées de drosophiles transgéniques que ces sites sont bien impliqués dans la régulation de l'expression des gènes du complexe *Bithorax-C*. Nous voulons étendre cette étude à l'ensemble du génome et pour cela nous envisageons de coupler la technique ChIP à une analyse sur micropuces à ADN.

Decoville, M., Giacomello, E., Leng, M. and Locker D. (2001), *Genetics*, **157** : 237-244. Daulny, A., Rappailles, A., Landemarre, L., Locker, D. and Decoville, M. (2003), *Genesis*, **36** : 104-113.

P47

MODULATION PAR LE CHOLESTEROL DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE : INFLUENCE SUR L'ACTIVITE DES P-GLYCOPROTEINES CHEZ *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Mickaël Riou, Fabrice Guégnard, Christine Koch et Dominique Kerboeuf.

INRA CR-Tours : UR086-BioAgresseurs, Santé et Environnement, équipe Multi-résistances et antiparasitaires, 37380 Monnaie, France. Riou M : tél – 02-47-42-77-00 poste 7012 et mél – riou@tours.inra.fr Kerboeuf D : tél – 02-47-42-77-53 et mél – kerboeuf@tours.inra.fr

Fax – 02-47-42-77-74

Les P-glycoprotéines ou P-gp, appartenant à la grande famille des ABC transporteurs, interviennent dans les mécanismes de résistance des nématodes aux différentes familles d'antiparasitaires utilisées en clinique vétérinaire. A l'heure actuelle, la modulation de l'activité de ces P-gp à l'aide d'inhibiteurs spécifiques ou de modulateurs constitue un des axes de recherche pour amélioration de l'efficacité des traitements médicamenteux. Cependant, ces inhibiteurs manquent de spécificité d'action et ils ont des effets secondaires pour l'hôte. Des travaux récents ont montré que l'environnement membranaire lipidique peut aussi moduler l'activité des P-gp. [1]. En particulier, les stérols paraissent prometteurs. Le représentant majoritaire chez les eucaryotes est le cholestérol, constituant essentiel des membranes, participant entre autre à leur fluidité. En effet, moins une membrane est riche en cholestérol, plus elle est fluide et réciproquement. Les modulations de la fluidité ont pour conséquences des changements d'activité des autres composants membranaires tels que les P-gp [1,2]. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce constituant. Une méthodologie mise au point précédemment nous a permis de changer la teneur en cholestérol (déplétion ou chargement) des œufs d'*Haemonchus contortus* grâce la méthyle- β -cyclodextrine libre (M β CD) ou complexée (chol-M β CD). La M β CD libre diminue la teneur en cholestérol des œufs, alors que la chol-M β CD l'augmente. Grâce à une sonde fluorescente spécifique des P-gp, nous avons montré que ces traitements jouent un rôle sur la modulation de l'activité des P-gp chez *Haemonchus contortus* [3]. D'autre part, la résistance des œufs estimée à l'aide des tests d'éclosion *in vitro* en présence d'anthelminthique augmente après le traitement par la M β CD et diminue après le traitement par la chol-M β CD [3]. Nous avons ici étudié l'effet de ces traitements sur la fluidité membranaire pour tenter d'expliquer les variations d'activité des P-gp ainsi observées. Quatre isolats d'*Haemonchus contortus* ont été retenus. La fluidité membranaire a été déterminée par la mesure de l'anisotropie, grâce à une sonde fluorescence, le diphénylhexatriène (DPH). Le traitement M β CD a diminué la valeur de l'anisotropie (augmentation de la fluidité membranaire). L'effet obtenu est similaire pour les quatre isolats. Il est comparable à l'effet induit sur d'autres modèles cellulaires. La diminution de la teneur en cholestérol augmente la fluidité membranaire et, en conséquence, l'activité des pompes. L'élimination des anthelminthiques est donc plus importante. Des variations ont été observées entre les isolats, apparemment liées à leur état d'embryonnement. Une étude de ce facteur a montré qu'il joue un rôle important dans la modulation de la fluidité. Ce paramètre est à rapprocher de la diminution très notable de la sensibilité des œufs pour les anthelminthiques au cours de l'embryonnement. Or, l'embryonnement s'accompagne d'un remaniement des enveloppes des œufs, en particulier des lipides. Le traitement chol-M β CD a diminué aussi la valeur de l'anisotropie pour les quatre isolats. L'effet obtenu dépend néanmoins de l'isolat. Il est l'inverse de celui attendu. L'augmentation de la teneur en cholestérol n'a donc pas conduit à la diminution de la fluidité membranaire. Ceci laisse supposer que le cholestérol agit d'une autre façon. L'hypothèse, pour expliquer ce résultat, est que le cholestérol pourrait être aussi un substrat des P-gp et donc agir directement sur la pompe sans modifier la fluidité membranaire.

Références :

1. Rothnie, A., *et al.* (2001). *EurBiophysic J*, **30**, 430-42.
2. Gimpl, G., *et al.*, (1997).. *Biochemistry*, **36**, 10959-74.-9.
3. Riou M, *et al.*, (2003) *J Antimicrob Chemother*, **52**(2):180-7.

P48

**DELIVRANCE DE CYTOKINES AVIAIRES PAR UN VECTEUR ADENOVIRAL:
IMMUNOMODULATION PAR L'IFN- γ .**

Rivas Christelle¹, Patrick Langlois² et Pascale Quéré¹

¹INRA, BASE, 37380 Nouzilly ²AFSSA, LCRAP, 22440 Ploufragan

L'adenovirus aviaire CELO non pathogène est un vecteur répliatif potentiel pour la délivrance de cytokines chez le poulet. L'inoculation de l'adenovirus recombinant Ad-ZIP, pour lequel le gène de l'enzyme phosphatase alcaline placentaire humaine (SEAP) a été inséré sous pCMV dans le vecteur adenovirus aviaire CELO délété des ORFs 9, 10, 11 (Ad), montre que l'activité enzymatique est détectable de 1 à 3 jours p.i. dans le sérum. La voie sous-cutanée d'inoculation s'avère 6,5 fois plus efficace que la voie intraveineuse. L'IFN- γ est une cytokine primordiale dans l'arsenal défensif contre de nombreux virus et tumeurs, par sa capacité en particulier à activer les macrophages. L'inoculation par voie sous-cutanée de 5×10^7 UFP d'Ad-IFN- γ à des poulets de 5-6 semaines n'induit pas de pathogénicité par comparaison avec celle du contrôle Ad-GFP (Green Fluorescent Protein). La capacité à proliférer des lymphocytes est significativement augmentée par l'Ad-IFN- γ dans le sang 3 jours p.i. et dans la rate de 3 à 14 jours p.i. La production de l'oxyde nitrique par les macrophages, en réponse à l'IFN- γ , est augmentée par l'Ad-IFN- γ dans le sang du 7 au 14ème jour. La réponse des macrophages de la rate n'apparaît pas modifiée. Par comparaison, Ad-IFN- γ inoculé par voie intraveineuse n'induit aucune de ces réponses immunes dans le sang ou la rate de 3 à 7 jours p.i. En conclusion, le vecteur adénovirus CELO apparaît efficace pour produire *in vivo* une cytokine passant dans le sang et capable d'une activité immunomodulatrice.

Correspondant : Christelle Rivas, INRA, BASE, 37380 Nouzilly.

Tel : 02 47 42 79 86. Fax : 02 47 42 77 74. E-mail : rivas@tours.inra.fr

P49

VOLTAGE-GATED SODIUM CURRENT: INVASION ENHANCER IN A METASTATIC BREAST CANCER CELL LINE

Roger S, P. Besson and J-Y Le Guennec

Nutrition, Croissance et Cancer, Inserm Emi-U 0211, 2 Bd Tonnellé, 37032 Tours cedex, France

Membrane potential and ionic channels are now studied not only in excitable cells but also in non excitable cells since they appear to be involved in an increasing number of cell functions and in different pathologies. Their involvement in cell proliferation as well as in tumor invasiveness was demonstrated in several cancers.

In this study, we first compared the motility (through a filter with 8 μm pore size) and invasion (through the same filter coated with a film of Matrigel®) of three human breast cancer cell lines: MCF-7, MDA-MB-468 and MDA-MB-231. We found that MDA-MB-231 cells are the most invasive cells, i.e. they readily digest Matrigel® then migrate through the filter, then comes MDA-MB-468 cells and last MCF-7 cells which are the least invasive cells. Then with the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, we found that the MDA-MB-231 cells express a voltage-gated sodium current while MCF-7 and MDA-MB-468 do not.

This current is sensitive to high concentration of tetrodotoxin (TTX, $\text{IC}_{50} = 1.78 \pm 0.20 \mu\text{M}$) and can be considered as a TTX-resistant current. Its threshold is around -55 mV , it reaches a maximal amplitude between -15 and -5 mV and it reverses around $+60 \text{ mV}$. The half-activation and half-inactivation voltages are $-31.1 \pm 0.1 \text{ mV}$ and $-64.1 \pm 0.2 \text{ mV}$ respectively ($n = 26$ cells). The superposition of availability-voltage curve and conductance-voltage curve on the same graph shows a window of voltage between -60 and -10 mV where the channels are slightly activated and not fully inactivated. Since the mean membrane potential of these cells is around -30 mV , this window of voltage allows a continuous entry of sodium ions into the cells.

When $30 \mu\text{M}$ TTX were added to the culture medium, to fully block this current, neither proliferation nor migration through an $8 \mu\text{m}$ diameter pore filter were affected. On the contrary, TTX significantly reduced the invasion ability of the cells (by about 30%). We conclude that this fast inward sodium current is involved in the invasiveness properties of MDA-MB-231 cells through pathways which have to be determined, possibly through the regulation of sodium homeostasis.

A COMPARATIVE STUDY OF THE NLS-DEPENDENT AND THE SUGAR-DEPENDENT NUCLEAR IMPORTS

Rondanino Christine, Annie-Claude Roche and Michel Monsigny

Glycobiologie, Vectorologie et Trafic Intracellulaire, Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, F-45071 Orléans Cedex 2, France.

Phone: 33 2 38 25 78 54. E-mail: rondanin@cnrs-orleans.fr

Proteins with a molecular mass larger than 40 000 are not imported into the nucleus while their glycosylated derivatives, such as serum albumin bearing about 25 α -glucosyl residues (neoglycoproteins), are efficiently imported [1,2]. The sugar-dependent nuclear import was recently shown to be cell cycle dependent and importin-independent [3]. Here, we compare the mechanisms underlying the NLS-dependent and the sugar-dependent nuclear imports in living cells by making use of microinjection (a non-disruptive approach) under stress conditions as well as in the presence of various types of inhibitors of cellular functions. Fluorescent probes: F-BSA (a bovine serum albumin (M_r 67 500) substituted with a fluorescein derivative), R-,NLS-BSA (a BSA substituted with a rhodamine derivative and about 10 NLS peptides) and R-,Glc-BSA (a BSA substituted with a rhodamine derivative and about 25 α -D-glucopyranosyl moieties) were injected into the cytoplasm of HeLa cells. The intracellular localization of fluorescent probes was analyzed by confocal microscopy.

The two nuclear imports occurred in non-dividing cells and required the heat shock cognate protein 70 (hsc70 protein) or hsc70-like proteins; conversely, striking differences were evidenced when cells were submitted to various stress conditions. The sugar-dependent import pathway was found to be more efficient in cells exposed to heat shock (45°C for 1 hour) and was not inhibited upon incubation in the presence of hydrogen peroxide or ethanol. On the contrary, the NLS-mediated pathway was decreased or blocked under these conditions.

Furthermore, the import of the neoglycoproteins was not inhibited in the presence of a GTP competitive inhibitor, known to abolish the NLS-dependent nuclear import.

1. E. Duverger, V. Carpentier, A.C. Roche, M. Monsigny, Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol, *Exp. Cell Res.* 207 (1993) 197-201.
2. E. Duverger, C. Pellerin-Mendes, R. Mayer, A.C. Roche, M. Monsigny, Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway, *J. Cell Sci.* 108 (1995) 1325-1332.
3. C. Rondanino, M.T. Bousser, M. Monsigny, A.C. Roche, Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells, *Glycobiology* 13 (2003) 509-519.

P51

CONCEPTION DE 1,2,3-TRIAZOLO-CARBANUCLEOSIDES CIBLANT LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC) DANS UN SYSTEME REPLICON

Saito Y.,¹ N. Joubert,¹ V. Escuret,² D. Durantel,² F. Zoulim,² R.F. Schinazi³ et L.A. Agrofoglio^{1*}

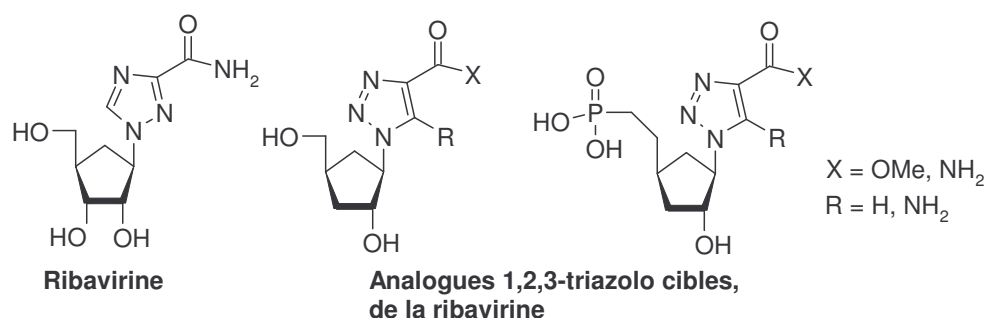
¹ Institut de Chimie Organique et Analytique - UMR 6005, Université d'Orléans, BP 6759 45067 Orléans - Fr Tél : 02-3849-4582 Fax : 02-3841-7281 E-mail : luigi.agrofoglio@univ-orleans.fr

² Inserm U271, 151 Cours Albert Thomas, 69003 Lyon – Fr

³ Veterans Affairs Medical Center and Lab. Biochem. Pharmacol., Emory University, Atlanta – GA 30033 - USA

L'hépatite C (VHC) reste un problème majeur de santé avec environ 200 à 300 millions de personnes infectées dans le monde. En dépit des programmes de dépistage pour un diagnostic précoce, et d'un traitement basé sur une combinaison d'interféron pégylé et de ribavirine (virazole®, 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), 40 à 50% des patients sont non répondeurs à ce traitement. Récemment, de nombreuses avancées dans la compréhension du mécanisme de réplication du VHC et dans le développement de modèles d'infection (réplicons), ont été réalisées. Des diverses enzymes putatives, la polymérase NS5B joue un rôle central dans la réplication virale.

L'importance pharmaceutique des carbanucléosides nous a poussés à concevoir des dérivés 1,2,3-triazolo de la ribavirine. Puisqu'une des activités supposées de la ribavirine est l'inhibition de l'*inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH)*, la synthèse d'analogues carbocycliques de phosphononucleosides a été aussi réalisée. La synthèse et l'évaluation antivirale des composés cibles seront présentées.



Ces travaux ont été réalisés avec le concours de Région Centre dans le cadre de soutien de programme et de financement d'une bourse BDI (N. Joubert). RFS bénéficie d'un financement du NIH 1RO37-AI-41980, du VA et de Emory University AIDS Center.

P52

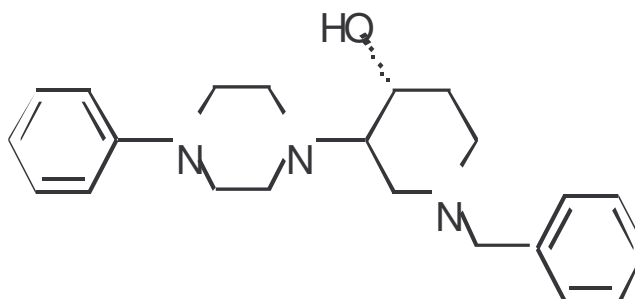
SYNTHESE D'ANALOGUES DU BENZYLTROZAMICOL, SONDES POTENTIELLES UTILISABLES EN SPECT OU EN PET POUR VISUALISER ET ETUDIER LE TRANSPORTEUR VESICULAIRE DE L'ACETYLCHOLINE

Thaer Assaad, Sylvie Mavel, Patrick Emond, Marie-Laure Drossard, Moussa I. Diarra, Stanley M. Parson*, Sylvie Chalon, Yves Frangin, Denis Guilloteau.

INSERM U316, Laboratoire de Biophysique Médicale et Pharmaceutique, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université François Rabelais, 31 avenue Monge, 37200 Tours.

* University of California, Department of Chemistry and Biochemistry, Santa Barbara, CA 93106, USA. Tél.: 02 47 36 72 40 - Fax: 02 47 36 72 24 - E-mail: frangin@univ-tours.fr

L'emploi de sondes de la famille du vésamicol dans les études sur la maladie d'Alzheimer est basée sur le fait que certaines de ces sondes seraient susceptibles de quantifier spécifiquement le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) par les techniques scintigraphiques, sachant que le VACHT est impliqué dans la maladie. Notre but consiste à synthétiser de nouveaux dérivés de l'azabenzyltrozamicol qui a une structure proche de celle du vésamicol. Ces dérivés pourront être utilisés en imagerie nucléaire soit marqués à l'iode-123 pour le SPECT, soit au fluor-18 ou au carbone-11 pour le PET.



azabenzyltrozamicol

La synthèse de ces composés se fait en 5 étapes. L'étape clé est l'attaque nucléophile de l'époxyde de la pipéridine par la phénylpipérazine. La capacité de ces composés à se lier au VACHT a été déterminée sur les vésicules synaptiques de la torpille électrique. Par ailleurs, pour 6 dérivés, des essais préliminaires *ex vivo* ont été réalisés sur des rats (0.1 μ mol de composé par kg de rat) en compétition avec le (-)-5-iodobenzovésamicol qui est un ligand spécifique des VACHT. Les résultats obtenus confirment ceux qui ont été observés *in vitro*.

P53

DETERMINATION DU SITE D'ACTION DE LA SECRETASE IMPLIQUEE DANS LIBERATION DE LA FORME GERMINALE DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE-I (ECAG).

Thimon V., Métayer S., Belghazi M.*, Dacheux J-L., Gatti J-L.

« Gamète Male et Fertilité » et *Service de protéomique, UMR 6073 INRA-CNRS, Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA Nouzilly, 37380 Monnaie, France

Tel : 33 247 427 803 Fax : 33 247 427 743

Les spermatozoïdes acquièrent progressivement leur pouvoir fécondant lors du transit dans l'épididyme, long tube pelotonné reliant le testicule au canal déférent. Cette acquisition résulte d'interactions entre les sécrétions épидидymaires et la membrane des spermatozoïdes, en particulier l'ajout, la transformation ou la disparition de certains composés protéiques. Le laboratoire a montré que la forme germinale de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECAG), une protéine d'environ 110 kDa présente sur la membrane des spermatozoïdes testiculaires, est libérée dans le fluide lors de leur passage dans la région antérieure de l'épididyme (1). Cette protéine reste ensuite dans le fluide et est retrouvée dans le plasma séminal. Le travail présenté montre que la libération de l'ECAG de la membrane des spermatozoïdes résulte d'un clivage protéolytique. Cette coupure a lieu au niveau de la région d'ancrage de la protéine et un fragment d'environ 12 kDa contenant l'extrémité C-terminale apparaît dans la membrane des spermatozoïdes de la région antérieure de l'épididyme. Ce fragment disparaît ensuite dans les régions suivantes. Un test réalisé *in vitro* indique que l'ECAG serait libérée par une protéase de type serine-protéase présente dans le fluide de la zone 2/3 de l'épididyme, zone où se fait la protéolyse *in vivo*. Afin de caractériser et de purifier cette sécrétase, il semblait important de déterminer avec précision son site d'action sur l'ECAG. Pour cela nous avons d'abord déterminé la séquence nucléotidique de l'ECAG par RT-PCR à partir d'ARN de testicule de bélier. L'intégralité de la séquence de l'ECAG a été obtenue et elle présente plus de 80% d'homologie avec celle de la souris et 90% avec celle de l'homme. Nous avons ensuite utilisé la spectrométrie de masse pour déterminer la séquence peptidique de l'extrémité C-terminale de l'ECAG soluble. L'ECAG a été purifiée par HPLC soit à partir du fluide de la zone 2 (zone de libération), soit du fluide de la queue de l'épididyme. Les fractions contenant l'ECAG purifiée ont été soumises à une coupure par l'endoprotéinase-C afin de générer des fragments peptidiques ayant une lysine comme acide aminé C-terminal. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que pour les deux préparations un fragment obtenu ne correspond pas à une coupure en lysine. Le fragment correspond à la séquence LGWPQYNWTPNSAR pour l'ECAG de la zone 2 et LGWPQYNWTPNSA pour celle provenant de la queue de l'épididyme. L'identité de ces fragments a été confirmée par l'analyse en MS-MS.

Ces résultats démontrent qu'*in vivo* l'ECAG est libérée de la membrane des spermatozoïdes suite à un clivage protéolytique similaire à ce qui a été décrit pour l'ECA somatique (ECAs) et le site de clivage déterminé est le même que celui qui a été obtenu *in vitro* lors de l'expression cellulaire de l'ECAs et de l'ECAG humaine (2). Ce C-terminal semble ensuite perdre un acide aminé après la libération. Le site de coupure obtenu, après une Arg, semble en accord avec l'identité d'une serine protéase comme sécrétase pour l'ECA.

1- Gatti *et al.*, 1999, *Biology of Reproduction*, 62 :937-945.

2- Woodman *et al.* 2000, *Biochem J.* 347 :711-718.

P54

**ETUDE DE LA PINOCYTOSE ET DE LA CYTOTOXICITE DES VECTEURS
MAGNETIQUES D'ANTICANCEREUX**

Louise Voultoiry,^a Igor Chourpa,^{a*} Claude Linassier,^b Laurence Douziech-Eyrolles^a et Pierre Dubois.^a

^aLaboratoire de Chimie Analytique, EA 2098, UFR de Pharmacie de Tours.

^bService d'Oncologie Médicale, CHU Bretonneau, Tours.

La vectorisation magnétique d'anticancéreux fait partie des nouvelles voies en cours de développement visant à améliorer l'efficacité des chimiothérapies des tumeurs. Cette vectorisation peut être obtenue par guidage magnétique de nanoparticules superparamagnétiques, porteuses d'un principe actif, vers la cible tumorale. A ce jour, l'efficacité limitée des systèmes décrits dans la littérature exige une meilleure compréhension et maîtrise de ces vecteurs magnétiques.

Le présent travail décrit les premiers tests d'activité biologique effectués sur des nanoparticules et les anticancéreux seuls. Les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer ont été synthétisées au laboratoire. Les agents anticancéreux étudiés dans ce travail sont la doxorubicine et la mitoxantrone, employées en clinique pour traiter les tumeurs solides pour lesquelles cette méthode de vectorisation est particulièrement appropriée. Nous avons mis au point un modèle utilisant la lignée cellulaire HL-60 pour tester la furtivité des particules à l'égard des cellules phagocytaires et pour étudier leur cytotoxicité.

Nous avons montré l'absence de toxicité des particules nues, dans des conditions utilisables pour la vectorisation *in vivo*. Les IC50 obtenues pour chaque principe actif sont en accord avec les données de la littérature et représentent des repères pour l'évaluation des nouvelles formulations. Afin de corréliser cette cytotoxicité avec les événements à l'échelon d'une cellule isolée, nous avons étudié les distributions intracellulaires de chaque principe actif par microspectrofluorimétrie confocale.

*auteur correspondant : tél. 02-47-36-71-62 ; fax 02-47-36-71-63 ; chourpa@univ-tours.fr