

## POSTERS

<b>P1 – Multi-center prevalidation using a new <i>in vitro</i> reconstituted human corneal epithelial model to assess the eye irritating potential of chemicals.</b>	
Alépée N., Catoire S., Chevalier S. ....	5
<b>P2 – Validation of an airway epithelium model to assess pulmonary irritancy <i>in vitro</i>.</b>	
Alépée N., Catoire S., Montbroussou E., Mignot A., Domingo I., Masson M-T., Bonnet M-C., Herbet A., Chevalier S. ....	6
<b>P3 – Membrane TNF controls mycobacterial infection.</b>	
Allie N., Jacobs M., Yermeev V., Alexopoulou L., Quesniaux V., Kollias G., Ryffel B. ....	7
<b>P4 – N-Glycoproteines de tissus de <i>Mammillaria gracillis</i> en culture <i>in vitro</i>.</b>	
Balen B., Krsnik-Rasol M., Zadro I., Vakhrushev S., Peter-Latalinic J. ....	8
<b>P5 – Acides gras polyinsaturés omega-3 et protéome des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231.</b>	
Barascu A., Besson P., Le Floch O., Belghazi M., Dacheux J-L., Bougnoux P., Jourdan M-L. ....	9
<b>P6 – Induction de la glucokinase chez le poulet : stimulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle.</b>	
Berradi H., Taouis M., Rideau N. ....	10
<b>P7 – Phosphorylation de la transposase <i>Mos-1</i> : Analyses biochimiques et impact sur la transposition.</b>	
Brillet B., Augé-Guillou C., Bigot Y. ....	11
<b>P8 – Une collection d'échantillons biologiques à stocker ? Pensez au centre de ressources biologiques !</b>	
Bruneau C., Jourdan M-L., Desbois I., Watier H., Blesbois E. ....	12
<b>P9 – Etude de l'épidémiologie et des mécanismes de résistance aux antibiotiques de souches de <i>Campylobacter coli</i> isolées en élevage porcin.</b>	
Cagliero C., Payot S., Laroche M., Federighi M., Magras C. ....	13
<b>P10 – Régulation du système d'efflux multidrogues CmeABC chez <i>Campylobacter jejuni</i> : mise en évidence de la diminution d'affinité du répresseur CmeR chez une souche multirésistante aux antibiotiques.</b>	
Cagliero C., Payot S., Maurel M-C., Cloeckart A. ....	14
<b>P11 – Arthropod-derived histamine binding protein prevents murine allergic asthma.</b>	
Couillin I., Vargafting B., Jacobs M., Paesen G., Nuttall P., Maillet I., Lefort J., Moser R., Weston-Davies W., Ryffel B. ....	15
<b>P12 – Etude fonctionnelle des phosphatidyl ethanolamines binding protein (PEBP) chez <i>Drosophila melanogaster</i>.</b>	
Décoville M., Gombault A., Rapailles A., Locker D. ....	16
<b>P13 – Expression and role of the AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rat ovary and pituitary.</b>	
Dupont J. ....	17

<b>P14 – Relationship between glutamine synthetase activity and epilepsy. Myth or reality ? A study conducted with a murine model and various glutamine synthetase inhibitors.</b>	
El Wafi M., Lapoule E., Gefflaut T., Bolte J., Richard O., Pichon J., Montecot-Dubourg C.....	18
<b>P15 – Fatal <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88.</b>	
Fremond C., Yermeev V., Nicolle D., Jacobs M., Quesniaux V., Ryffel B.....	19
<b>P16 – Influence de différents éliciteurs sur la production de métabolites secondaires de divers explants d'<i>Hypericum perforatum</i> L. cultivés <i>in vitro</i>.</b>	
Gadzovska S., Maury S., Hano C., Lamblin F., Spasenoski M., Joseph C., Hagège D.....	20
<b>P17 – A new potent bradykinin-degrading enzyme : Cathepsin K.</b>	
Godat E., Lecaille F., Desmazes C., Brömme D., Vandier C., Lalmanach G.....	21
<b>P18 – Effet du froid sur l’aptitude à fleurir d’une plante de grande culture : rôle de la méthylation de l’ADN.</b>	
Kamiri M., Causevic A., Delaunay A., Hagège D., Lefebvre M., Maury S.....	22
<b>P19 – Modulation du routage intracellulaire du récepteur FSH.</b>	
Kara E., Marion S., Guillou F., Crépieux P., Reiter E.....	23
<b>P20 – Automated blood sampling from awake laboratory animals coupled to 96-well sample preparation tools and LC/MS-MS.</b>	
Kissinger C., Kissinger P., Hilt R., Zhu Y., Parrod M., Cochet P., Bromet N.....	24
<b>P21 – PAPRICA: Pollution Aérienne et Respiratoire : Impact de la Communication sur l’Air.</b>	
Lacour S., Leblond V., Le Guellec S., De Monte M., Diot P.....	25
<b>P22 – Bradykinin-degrading properties if cathepsin K depends on its S2 substrate specificity.</b>	
Lecaille F., Godat E., Vandier C., Brömme D., Lalmanach G.....	26
<b>P23 – FSH activates p70 S6 kinas by protein kinase A-mediated dephosphorylation of Thr421/Ser424 and modulates mRNA translatability indifferiated primary Sertoli cells.</b>	
Lécureuil C., Tesseraud S., Kara E., Martinat N., Sow A., Fontaine I., Gauthier C., Reiter E., Guillou F., Crépieux P.....	27
<b>P24 – Sélection et caractérisation d’ARN synthétiques ligands de la protéine prion ovine recombinante.</b>	
Mercey R., Maurel M-C., Lantier I., Lantier F., Marc D.....	28
<b>P25 – Brain microdialysis coupled to blood sampling. Application to the morphine determination by LC/MS-MS in both extracellular fluid and rat plasma.</b>	
Meunier L., Parrod M., Kissinger C., Kissinger P., Le Guen S., Genin E., Paul G., Bromet N.....	29
<b>P26 – Apport de la spectrometrie de masse Maldi-Tof à l’étude de la fragmentation d’anticorps IgG.</b>	
Michel O., Magdelaine C., Blin M., Moulard M., Canton M., Watier H., Pacaud-Mercier K.....	30
<b>P27 – Adaptation à la sécheresse chez le peuplier : bases génétiques de la productivité et de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone.</b>	
Monclus R., Bastien C., Brignolas F., Delmotte F., Dreyer E., Villar M., Jorge V.....	31

<b>P28 – Chronic treatment of mice with the broad spectrum herbicide phophinothricin : behavioural and histological studies.</b>	
Montecot-Dubourg C., Richard O., Gefflaut T., Bolte J., Resina S., El Wafi M., Pichon J.....	32
<b>P29 – Expression and regulation of the Stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 2 (SCD2) in rat ovary.</b>	
Moreau C., Froment P., Moreau V., Dupont J.....	33
<b>P30 – MyD88 is essential for bronchoconstriction and neutrophil sequestration in the lung.</b>	
Noulin N., Quesniaux V., Maillet I., Vargaftig B., Ryffel B., Couillin I.....	34
<b>P31 –Cannabis puis autres « Drogues », y-a-t-il un risque ? Approche neurochimique/</b>	
Oudin A., Decrop M., Ernouf D.....	35
<b>P32 – Etude de l'expression des gènes de la superfamille Thiorédoxine par PCR Quantitative dans le cancer broncho-pulmonaire.</b>	
Panel V., Desmazes C., Esnard A., Guyetant S., Esnard F.....	36
<b>P33 – Altered gene expression in rat mesenteric tissues following in vivo exposure to a phosphodiesterase 4 inhibitor.</b>	
Pawlowski V., Dagues N., Benabed S., Ledieu D., Sobry C., Hanton G., Chevalier S.....	37
<b>P34 – Edelfosine decreases tetraethylammonium-sensitive currents of human breast cancer cell line MDA-MB-435S.</b>	
Potier M., Roger S., Besson P., Le Guennec J-Y., Bougnoux P., Vandier C.....	38
<b>P35 – Régulation par l'environnement membranaire de l'activité des P-glycoprotéines d'un nématode parasite responsables de chimio-résistance aux traitements.</b>	
Riou M., Guégnard F., Le Vern Y., Grasseau I., Koch C., Blesbois E., Kerboeuf D.....	39
<b>P36 – Etude comparée du développement des neurones et des astrocytes en culture.</b>	
Robert F., Guérin M., Hévor T.....	40
<b>P37 – Voltage-gated sodium channels : invasion enhancers in non-small cell metastatic lung cancer cell lines.</b>	
Roger S., Rollin J., Besson P., Gruel Y., Le Guennec J-Y.....	41
<b>P38 – Use of karyophilic sugars to enhance the nuclear import of plasmids.</b>	
Rondanino C., Duverger E., Roche A-C., Monsigny M.....	42
<b>P39 – Safe homogenisation of infected tissues with a disposable homogeniser.</b>	
Schnyder B., Yermeev V., JacobsM., Torres D., Quesniaux V., Bucher F., Moser R., Ryffel B.....	43
<b>P40 – Rôle de la PEBP/RKIP dans le cancer et dans son traitement.</b>	
Schoentgen F., Kieda C.....	44
<b>P41 – Relation entre l'analyse phénotypique et génotypique de souches faiblement virulentes de <i>Listeria monocytogènes</i>.</b>	
Témoin S., Roche S., Gracieux P., Albert I., Grépinet O., Cossart P., Velge P.....	45
<b>P42 – Characterisation of phosphatase and TENSin homolog deleted on chromosom 10 (PTEN) in chicken muscle.</b>	
Tesseraud S., Vaudin P., Duchene S., Dupont J.....	46
<b>P43 – Drug-induced phospholipidosis detected in rat and human cultured white blood cells.</b>	

Tilloy A., Rodde F., Masson M-T., Sobry C., Monpon P., Bonnet M., Hougham C., Slaughter M., Chevalier S.....	47
<b>P44 – Protective role of membrane TNF in the host resistance to <i>Listeria</i> infection.</b> Torres D., Janot L., Maillet I., Quesniaux V., Ryffel B., Erard F.....	48
<b>P45 – Déroulement de doubles hélices ARN-ADN par une hélicase hexamérique : le facteur de terminaison transcriptionnelle RHO d'<i>Escherichia coli</i>.</b> Walmacq C., Boudvillain M., Rahmouni R.....	49
<b>P46 – Characterization of hepatotoxicité profiles and metabolism related toxicity in rat liverbeads and WIF-B9 cell line.</b> Montbroussoul E., Borde F., Lagelle F., Bender V., Bouskila M., Blazy F., Nicaise L., Mignot A., Bonnet M-C., Brizard P., Masson M-T., Chevalier S., Cassio D., Biagini C.....	50
<b>P47 - Présence d'une forme libre de furine PC2 dans le fluide épидидymaire.</b> Thimon V., Dacheux J-L., Gatti J-L.....	51
<b>P48 – Extraction différentielle des protéines membranaires pour l'obtention de marqueurs de maturation spermatiques.</b> Belleannée C., Belghazi M., Boursier C., Gatti J-L., Druart X., Dacheux J-L., Dacheux F.....	52
<b>P49 – Fast establishment of hairy root clones producing high ajmalicine and serpentine contents in <i>Catharanthus roseus</i>.</b> Guillon S., Thiersault M., Rideau M., Gantet P., Trémouillaux-Guiller J.....	53
<b>P50 – Secretory activity of boar caput epididymal epithelial cells in culture.</b> Bassols J., Bonet Sergi., Dacheux F., Dacheux J-L.....	54
<b>P51 – Identification des épitopes neutralisants de la protéine majeur de capsid du papillomavirus humain de type 31 à l'aide d'anticorps monoclonaux.</b> Fleury M., Touzé A., Alvarez E., Carpentier G., Maurel M-C., Vautherot J-F., Coursaget P.....	55
<b>P52 – Etude du rôle métabolique de trois gènes localisés dans un nouvel îlot de pathogénicité potentiel (EPI-I<sub>BEN2908</sub>) de la souche d'<i>Escherichia coli</i> pathogène aviaire BEN2908.</b> Chouikha I., Germon P., Moulin-Schouleur M., Schouler C.....	56
<b>P53 – Réplication et morphogénèse du virus de la maladie de Mark : Etiquetage de gènes viraux dans un contexte BACRBIB.</b> Chbab N., Francineau A., Vautherot J-F.....	57



## P1

**Multi-center prevalidation using a new *in vitro* reconstituted human corneal epithelial model to assess the eye irritating potential of chemicals.**

N. Alépée, S. Catoire, and Stephan Chevalier

Pfizer Global R&D (France)

The development of *in vitro* alternatives to *in vivo* eye irritation (Draize) testing in animals is stimulated by scientific and ethical considerations. This multi-center study aimed at evaluating the predictive power of a new commercially available human cornea model (SkinEthic, Nice, France) to assess acute ocular irritation. When cultivated *in vitro* on a polycarbonate filter in chemically defined medium, the Human Corneal Epithelial (HCE) cells of the immortalized cell line HCE (provided by Prof. Roger Beuerman, LSU Eye Center, New Orleans, USA) form a corneal epithelial tissue, resembling histologically the epithelial corneal cell layers of the human eye. Since the reconstituted epithelium grows at the air-liquid interface, solutions, formulations and water insoluble compounds can be assayed for their irritation potential. For this interlaboratory evaluation, a prevalidation approach (protocol optimization, transfer and performance) was used in order to provide sufficient evidence of the relevance (predictivity) and reliability (reproducibility) of the reconstituted human corneal epithelium (HCE) model. At each of the 4 participating laboratories, 25 reference chemicals, ranking from 'non' to very severe eye irritating, were applied topically to the HCE cultures and different treatment times were applied. The rate of cytotoxicity (tissue viability and histological analysis) was compared to published *in vivo* acute eye irritation as well as existing data obtained in the Bovine Corneal Opacity Permeability (BCOP) test.. A very good inter-laboratory reproducibility was obtained (correlation coefficient  $r > 0.82$ ). Additionally, the *in vitro* data correlated well with BCOP scores, however correlation analysis with available Draize eye data resulted in lower values due to the often-conflicting existing Draize eye test information.

## P2

**Validation of an airway epithelium model to assess pulmonary irritancy *in vitro*.**

Nathalie Alépée, Sophie Catoire, Elodie Montbroussou, Aurélien Mignot, Isabelle Domingo, Marie-Thérèse Masson, Marie-Claire Bonnet, Aurélia Herbet and Stephan Chevalier.

*PGRD Safety Sciences Europe.*

The occurrence of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in industrialized countries has been increasing for the past 30 years. Inhaled corticosteroids (ICS), long acting anticholinergics and long acting beta2-adrenoceptor agonists (LABA) could be administered for both clinical indications. A 3-dimensional *in vitro* airway epithelium model has been developed to predict potential lung irritation effect induced by inhaled chemical entities.

The Calu-3 cells, derived from a submucosal adenocarcinoma of a 25 year-old Caucasian male, are human bronchial epithelial cells of the respiratory tract (Foster et al, 2000). They form a 3-dimensional epithelium model when placed on a polycarbonate filter at the air-liquid interface. Ciliogenesis, production of mucin (a major macromolecular component of mucus) and functional barrier structures such as tight junctions have been observed in Calu-3 cell cultures (Foster et al, 2000; Figure 1). Two drugs marketed for the treatment of respiratory diseases were evaluated in the Calu-3 model. A multiple end-point analysis approach (measurement of cell viability, membrane integrity, inflammatory responses, trans-epithelial resistance, mucins and histological analyses) was implemented. The reproducibility of the data and the *in vitro/in vivo* correlation indicate that this model could be used to rank formulations and chemical entities.

## P3

**MEMBRANE TNF CONTROLS MYCOBACTERIAL INFECTION**

Nasiema ALLIE, Muazzam JACOBS, Vladimir YEREMEEV, Lena ALEXOPOULOU, Valerie J.F. QUESNIAUX, George KOLLIAS, Bernhard RYFFEL

CNRS, IEM, Orleans, University of Cape Town, RSA, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy

Tumour necrosis factor (TNF) plays a critical role in the recruitment and activation of mononuclear cells in mycobacterial infection. The role of transmembrane TNF (TM-TNF) in host resistance is unknown and was tested in knock-in mice expressing instead of endogenous TNF a non-cleavable and therefore membrane-bound, non-secreted TNF. While mice with complete TNF deficiency (TNF  $-/-$ ) succumbed to infection, TM-TNF mice were able to control *M. bovis* BCG infection and survived the 12 week experimental period. In contrast to a complete TNF deficiency, TM-TNF allowed a substantial recruitment of activated T cells and macrophages with granuloma formation and expression of iNOS. Using aerosol infection with *M. tuberculosis* we confirm that membrane TNF conferred a partial protection as 50 % of TM-TNF mice survived 10 weeks, while all TNF  $-/-$  mice died within 6-7 weeks. Therefore, the data suggest that membrane expressed TNF plays a critical role in host defence to mycobacterial infection and may partially substitute for secreted TNF.

## P4

**N-GLYCOPROTEINES DE TISSUS DE *MAMMILLARIA GRACILLIS* EN CULTURE *IN VITRO***

Balen Biljana<sup>1</sup>, Krsnik-Rasol Marijana<sup>1</sup>, Zadro Ivana<sup>1</sup>, Vakhrushev Sergey<sup>2</sup> and Peter-Katalinić Jasna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 1000 Zagreb, Croatia, [bbalen@zg.biol.pmf.hr](mailto:bbalen@zg.biol.pmf.hr) <sup>2</sup>Institut for medical Physics and Biophysics, University of Muenster, Robert-Koch-Strasse 31, 48149 Muenster, Germany.

De très nombreuses protéines fonctionnelles chez les eucaryotes sont glycosilées. La recherche de groupements glycosidiques à l'extrémité N-terminale (N-glycan) des protéines végétales s'est intensifié en raison du rôle physiologique attribué à ces structures (conformation, stabilité des protéines et activité biologique). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur la nature des glycoprotéines en rapport avec la différenciation et la transformation des cellules. En culture *in vitro*, le cactus *Mammillaria gracillis* Pfeiff. produit spontanément un cal habitué dont la croissance est indépendante des facteurs hormonaux. Ce cal est capable de régénérer des pousses normales ou hyperhydriques. Afin de comparer ces lignées habituées avec des lignées tumorales, les cellules de cactus ont été transformées avec *Agrobacterium tumefaciens*, souche sauvage B6S3 (tumeur TW). Cette tumeur se développe rapidement et ne présente aucune potentialité morphogénétique. Nous avons étudié les modifications des N-glycosylations dans les lignées habituées, les pousses régénérées normales, les pousses hyperhydriques et les lignées transformées ; puis recherché celles qui pouvaient être spécifiques des processus de développement. Les protéines ont été séparées par électrophorèse 1-D et 2-D sur gel polyacrylamide, transférées sur des membranes de nitrocellulose et traitées par des lectines marquées à la digoxigénine et à la biotine. La composition des N-glycanes a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et met en évidence que la majorité des oligosaccharides détectés sont d'un type complexe. La tumeur TW présente une plus grande diversité en N-glycanes que les tissus non transformés. Les résultats obtenus indiquent que la complexité des structures des N-glycanes augmente avec la perte de l'organisation tissulaire. Le profil de N-glycosylation des protéines cellulaires solubles peut être corrélé spécifiquement avec le niveau de morphogénèse de la lignée cellulaire de cactus concerné.



## P5

**ACIDES GRAS POLYINSATURES OMEGA-3 ET PROTEOME  
DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES MDA-MB-231**

Barascu Aurélie<sup>1</sup>, Besson Pierre<sup>1</sup>, Le Floch Olivier<sup>1</sup>, Belghazi Maya<sup>2</sup>, Dacheux Jean-Louis<sup>2</sup>, Bougnoux Philippe<sup>1</sup> et Jourdan Marie-Lise<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>"Nutrition, Croissance et Cancer", Equipe mixte INSERM-Université 0211, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex. 02.47.36.61.30. [Aurelia.Barascu@etu.univ-tours.fr](mailto:Aurelia.Barascu@etu.univ-tours.fr)

<sup>2</sup>UMR INRA-CNRS 6175 et "Service de Spectrométrie de Masse pour la Protéomique". INRA.37380 Nouzilly.

Parmi les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3, 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. Nous avons montré que le DHA et l'EPA diminuent la prolifération cellulaire des cellules MDA-MB-231 en ralentissant leur progression au cours de la phase G2/M. Par exemple, à 10, 30 et 50 µM de DHA, la phase G2/M dure respectivement 2, 5 et 7 fois plus longtemps que celle du témoin. Afin de déterminer quelles cibles du cycle cellulaire sont sensibles aux AGPI oméga-3, nous étudions actuellement l'effet du DHA et de l'EPA sur l'activité traductionnelle des cellules, par une approche protéomique. La séparation par électrophorèse bidimensionnelle montre qu'il existe des variations de production de certaines protéines dans les cellules traitées avec des concentrations croissantes de DHA. La protéine dont la production est la plus augmentée a été identifiée par spectrométrie de masse comme la protéine de choc thermique Hsp70. Cette famille de protéines protège les autres protéines cellulaires en facilitant leur reformation après un stress. Dans nos conditions, l'augmentation d'Hsp 70 pourrait être la conséquence d'un stress oxydant puisque le DHA, le plus insaturé de la série oméga-3, est très peroxydable. L'identification d'autres protéines cibles du DHA est maintenant nécessaire pour comprendre l'effet inhibiteur des AGPI oméga-3 sur la prolifération, effet vraisemblablement modulé par l'Hsp 70.

## P6

**Induction de la glucokinase chez le poulet : stimulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle.**

*Hanaâ Berradi*<sup>1</sup>, *Mohammed Taouis*<sup>2</sup>, *Nicole Rideau*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Régulation du Métabolisme des Oiseaux, Station de Recherches Avicoles, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Tours-Nouzilly, 37380 Nouzilly, France.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Endocrinologie de la Nutrition, bâtiment 447 Université Paris XI, France.

L'hexokinase IV, plus communément appelée glucokinase (GK), est un facteur primordial de l'homéostasie glucidique des mammifères. De plus, cet enzyme, adaptative à l'état nutritionnel, joue un rôle clé dans le stockage de nutriments. Précédemment, nous avons montré qu'un gène et une protéine homologues à la GK de mammifère s'exprimaient dans le foie et le pancréas de poulet. Dans cette étude, nous n'observons pas de différence significative de l'expression de cette GK aviaire entre des animaux nourris ou à jeun depuis 16h. La question qui s'est alors posée est la suivante : cette différence dans la régulation de la GK par rapport aux mammifères est-elle physiologique chez le poulet ou est-elle liée au mode d'alimentation *ad libitum* ? Pour répondre à cette question, nous avons mesuré les variations de la GK en fonction de l'état nutritionnel. Ces mesures se sont effectuées à trois niveaux : transcriptionnel (ARN), traductionnel (protéine) et post-traductionnel (activité enzymatique).

Pour cela nous comparons des poulets soumis à une alimentation fournie *ad libitum* tout au long de leur vie et des poulets toujours nourris par repas. Le jour de l'expérience, ces derniers sont divisés en différents lots : à jeun, re-nourris ou re-nourris et gavés au saccharose et les poulets *ad libitum* sont divisés en deux lots : nourris ou à jeun. Les prélèvements ont été réalisés 2h après le repas et 2h et 5h après le repas + gavage au saccharose. Sur ces animaux, outre les mesures de paramètres généraux (poids, poids de foie, insulïnémies et glycémies), nous avons mesurés les variations d'expressions du gène de la glucokinase de poulet, de la quantité de protéine et de l'activité enzymatique.

Les variations d'expression du gène, sont mesurés par la technique de RT-PCR en temps réel sur les ARN extraits du foie et du pancréas de ces poulets. Ceci nous a permis de comparer l'expression de la GK entre des poulets soumis à une alimentation fournie *ad libitum* et des poulets toujours nourris par repas. Dans le pancréas, on observe pas de différence significative selon les états nutritionnels. Dans le foie, les résultats montrent une stimulation de l'expression du gène après un repas. Cette stimulation est potentialisée par le gavage au saccharose, alors que chez les animaux nourris *ad libitum* toute leur vie, on observe pas de variation significative entre les animaux à jeun ou nourris. L'expression de la protéine GK est quantifiée par western-blot. Dans le foie, on observe une augmentation significative de la protéine avec le gavage au saccharose, alors que la quantité de GK ne varie pas dans le pancréas. L'activité enzymatique est mesurée grâce au couplage avec la glucose-6-phosphate-deshydrogénase. Les résultats concernant le foie montrent que l'activité GK est plus importante chez les poulets nourris par repas. En outre, cette activité augmente avec la prise alimentaire et est maximale avec le gavage au saccharose.

En conclusion, ces résultats convergent vers l'idée que la régulation de la GK est modifiée par l'alimentation *ad libitum*. L'expression de la protéine et l'activité enzymatique dans le foie sont stimulés dans le groupe repas après la réalimentation et le gavage au saccharose. Chez les mammifères, l'ARNm de la GK est rapidement dégradé, ceci pourrait être le cas chez le poulet et expliquerait que les niveaux d'ARNm GK n'évoluent pas en parallèle avec l'expression de la protéine et l'activité enzymatique. Ces résultats suggèrent que la régulation au niveau post-transcriptionnel et post-traductionnel est capitale.

## P7

**Phosphorylation de la transposase *Mos-1* : Analyses biochimiques et impact sur la transposition.**

Benjamin Brillet, Corinne Augé-Gouillou et Yves Bigot.

Laboratoire d'Etude des Parasites Génétiques - Université François Rabelais de Tours - UFR des Sciences et Techniques - Parc Grandmont - 37200 Tours - FRANCE

Tel: +33 (0)2 47 36 69 76 - Fax: +33 (0)2 47 36 70 35

Email: benjamin. [brillet@etu.univ-tours.fr](mailto:brillet@etu.univ-tours.fr)

*Mariner* est le transposon de classe II le plus répandu chez les eucaryotes. Afin d'étudier les différentes étapes de la transposition de *Mos-1*, de nombreux tests biochimiques et de transposition ont été réalisés en utilisant des transposases recombinantes produites en bactéries. Ces expériences ne reflètent pas forcément l'activité naturelle de la transposase de *Mos-1* qui est une protéine eucaryote. En effet, son activité peut-être régulée par des modifications post-traductionnelles. Ceci a été montré pour la transposase de l'élément *P*, régulée par phosphorylation chez *Drosophila*.

Nos résultats indiquent que la transposase de *Mos-1* est phosphorylée lorsqu'elle est produite en cellules eucaryotes. Pour connaître le nombre d'acides aminés phosphorylés, la transposase eucaryote a été analysée en gel bidimensionnel SDS-Page. Nous avons ensuite regardé l'impact de la phosphorylation sur la transposition. Puis, nous avons montré que la transposase phosphorylée possède une affinité réduite pour son ITR. Nous avons alors étudié différents mutants de phosphorylation, localisés dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine.

La transposase eucaryote étant phosphorylée sur d'autres acides aminés, leurs rôles sur la transposition en cellules eucaryotes est en cours d'étude.

## P8

## UNE COLLECTION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES A STOCKER ? PENSEZ AU CENTRE DE RESSOURCES BIOLOGIQUES !

**C Bruneau<sup>1</sup>, M-L Jourdan<sup>2</sup>, I Desbois<sup>1</sup>, H Watier<sup>3</sup>, E Blesbois<sup>4</sup>**

1- EFS Centre Atlantique (site de Tours) ; 2- CORAD (CHRU de Tours) ; 3- Université François Rabelais (Tours) ; 4- INRA Tours - Nouzilly

En collaboration avec l'INSERM, le CHU de Tours et l'IRSA

### **Introduction :**

Le CRBT (Centre de Ressources Biologiques de Touraine) est un centre de ressources biologiques régional né en 2002 d'une volonté commune à l'Université François Rabelais de Tours, l'EFS Centre – Atlantique, l'INRA de Tours – Nouzilly, l'IRSA et le CHRU de Tours. Ce projet fédérateur a été retenu et soutenu financièrement par l'INSERM et le Ministère Délégué à la Recherche. Le CRBT a été créé pour centraliser et standardiser la préparation, le conditionnement et le stockage d'échantillons biologiques d'origines diverses (humaine, animale, végétale, microbiologique), en apportant des garanties optimales de conservation et de traçabilité. Il permet de valoriser et pérenniser vos collections, en vous aidant à déposer les dossiers de demandes d'autorisation légales. Le CRBT est également un prestataire de service pour la gestion transitoire d'échantillons prélevés dans le cadre d'essais cliniques nationaux et internationaux conduits par des promoteurs industriels.

### **Matériel et méthodes :**

Structure : le CRBT est un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) doté d'un Conseil de Groupement chargé de s'assurer de la bonne exécution des travaux et d'un Comité Scientifique et Ethique chargé de valider la faisabilité et la mise en place des projets scientifiques, conformément aux exigences éthiques et réglementaires.

Environnement : le CRBT est situé dans les locaux de l'EFS Centre – Atlantique (site de Tours), établissement certifié ISO 9001-2000, comprenant un département de cryobiologie.

Gestion des échantillons : actuellement, la conservation se fait soit en azote liquide, en paillettes thermo-soudées de 0,3 à 0,5 ml, soit à  $-80^{\circ}\text{C}$ , en cryotubes. Cuves à azote et congélateurs sont reliés à des centrales de contrôle de température et d'alarme automatique. D'autres supports de conservation sont envisagés.

Les échantillons qui requièrent certaines modifications (centrifugations, extractions, purifications) peuvent éventuellement être traités par le CRB, selon ses possibilités actuelles et sur proposition de protocoles par le demandeur, selon les méthodes les mieux adaptées au projet d'analyse ultérieure.

Traçabilité : Les échantillons sont anonymisés et identifiés par code à barres. Les données liées aux prélèvements sont enregistrées sur un logiciel de gestion à accès contrôlé (BIOTEC 2000, Cryo Bio System), qui assure une mise à jour automatique de tout mouvement d'échantillon et la gestion de l'occupation des enceintes réfrigérées.

### **Résultats :**

Le CRBT accueille actuellement 12 collections d'origine humaine (biologie médicale et essais cliniques), dont 3 en partenariat avec des promoteurs privés, ainsi que 10 collections d'origine animale, en tant que site secondaire de la Cryobanque Nationale (INRA). Plus de 80 services et laboratoires, répartis sur 42 hôpitaux dans toute la France et même en Italie, participent à la constitution des collections regroupées sur le CRBT.

### **Conclusion :**

Le CRBT est une option sûre et confortable pour les équipes médicales et scientifiques qui souhaitent constituer des collections d'échantillons d'intérêt clinique, scientifique ou patrimonial, en s'appuyant sur les compétences et les moyens techniques d'une structure spécialisée dans le stockage et la traçabilité. Le CRBT n'accueille pas de fragments de tumeurs solides jusqu'à présent, mais un regroupement avec la tumorothèque du CHRU est un projet qui prend forme.

## P9

## Étude de l'épidémiologie et des mécanismes de résistance aux antibiotiques de souches de *Campylobacter coli* isolées en élevage porcin

C. Cagliero<sup>1</sup>, S. Payot<sup>1</sup>, M. Laroche<sup>2</sup>, M. Federighi<sup>2</sup>, C. Magras<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, UR086 BioAgresseurs, Santé, Environnement, Nouzilly, France.

<sup>2</sup>UMR ENVN/INRA 1014 SECALIM, École Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France.

*Campylobacter* est une cause majeure de gastro-entérites bactériennes chez l'homme. Une voie importante d'acquisition de la bactérie réside en l'ingestion d'aliments contaminés. Le porc représente, comme pour la volaille, un réservoir animal important pour la bactérie. Au problème de prévalence s'ajoute celui de la résistance aux antibiotiques qui a augmenté de façon inquiétante ces dernières années au niveau international chez ce genre bactérien. Peu de données sont actuellement disponibles en France sur la résistance aux antibiotiques des souches de *Campylobacter* isolées chez l'animal et particulièrement chez le porc.

Une campagne de prélèvements a donc été menée en 2002 sur 360 porcelets et 90 truies issus de neuf lots provenant de trois élevages porcins français. Quatre cent quarante deux souches de *C. coli* ont été isolées de prélèvements fécaux et analysées quant à leur résistance à 5 antibiotiques (ampicilline, acide nalidixique, ciprofloxacine, érythromycine et tétracycline). En moyenne, 57% des souches étaient résistantes à la tétracycline, 40% à l'acide nalidixique, 31% à la ciprofloxacine, 20% à l'érythromycine, et 3% à l'ampicilline. De plus, 9% des souches étaient multirésistantes. Une relation significative (analyse de variance,  $p < 0,015$ ) a été observée entre profils de résistance obtenus chez les truies et ceux de leurs porcelets respectifs. Par ailleurs, une variation significative ( $p < 0,05$ ) des profils de résistance a été constatée entre élevages et entre lots. Les niveaux précis de résistance ont été déterminés pour deux antibiotiques majeurs (ciprofloxacine et érythromycine) et une recherche de mutations dans les gènes cibles a été entreprise. Toutes les souches résistantes à la ciprofloxacine présentaient une modification Thr86Ile dans la sous-unité GyrA de la gyrase. Seules les souches présentant un niveau de résistance élevé à l'érythromycine (Concentration Minimale Inhibitrice supérieure à 256 µg/ml) portaient une mutation A2075G dans l'ARN 23S. Les autres souches résistantes à l'érythromycine mais de CMI inférieure (CMI égale à 8 ou 16 µg/ml) ne portaient pas de mutation en position 2074 ou 2075. Ces souches redevenaient sensibles sous l'action d'un inhibiteur de pompe d'efflux, suggérant l'implication de ce mécanisme dans la résistance.

## P10

## Régulation du système d'efflux multidrogues CmeABC chez *Campylobacter jejuni* : mise en évidence de la diminution d'affinité du répresseur CmeR chez une souche multirésistante aux antibiotiques

C. Cagliero<sup>1</sup>, S. Payot<sup>1</sup>, M.C. Maurel<sup>2</sup> et A. Cloeckeaert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR086 BioAgresseurs, Santé, Environnement, Nouzilly;

<sup>2</sup>UMR 6175 INRA-CNRS Université de Tours, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly.

*Campylobacter* est une cause majeure de gastro-entérites bactériennes chez l'homme. Ces dernières années, une augmentation de la résistance aux antibiotiques a été observée au niveau international chez ce genre bactérien. Parmi les différents mécanismes pouvant être mis en oeuvre par la bactérie, le mécanisme d'efflux consiste en un rejet de la drogue à l'extérieur de la cellule. Il fait intervenir des pompes d'efflux dont la surexpression peut aboutir à une résistance à de nombreuses familles d'antibiotiques (multirésistance). Chez *Campylobacter*, un système d'efflux tripartite, CmeABC, a été décrit comme étant impliqué dans la multirésistance aux antibiotiques.

Au laboratoire, un mutant d'une souche de *C. jejuni*, présentant une diminution de la sensibilité à différents antibiotiques, a été sélectionné *in vitro*. L'opéron codant CmeABC et son répresseur CmeR a été entièrement séquencé chez les deux souches (sauvage et multirésistante). Chez cette dernière, une mutation a été détectée dans la région opératrice, au niveau d'une séquence répétée-inversée qui pourrait constituer le site de fixation du répresseur. Des expériences de retard sur gel ont été réalisées avec la protéine CmeR préalablement purifiée afin de comparer sa fixation sur les régions opératrices (sauvage et mutée). Elles ont révélé une diminution de la fixation de CmeR sur la région opératrice mutée. Ces différences ont ensuite été confirmées et quantifiées par résonance plasmonique de surface (Biacore) en utilisant un ADN double brin biotinylé couplé à un sensor ship sensibilisé avec de la streptavidine et la protéine CmeR purifiée. Ces expériences ont permis de confirmer les résultats obtenus par retard sur gel et d'étudier la cinétique de l'interaction répresseur protéique-ADN. Les vitesses d'association et de dissociation ont été mesurées ce qui a permis de déterminer les constantes d'affinité et de dissociation de la protéine pour les régions promotrices sauvage ( $K_A = 1,43.10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D = 6,9 \text{ nM}$ ) et mutée ( $K_A = 5,37.10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_D = 180 \text{ nM}$ ). La mutation dans la région opératrice conduit à une chute d'un facteur 26 de la constante d'affinité du répresseur.

L'approche Biacore s'est révélée particulièrement intéressante pour ce projet. Elle pourrait permettre également d'approfondir l'étude de la régulation du système CmeABC (levée de répression par le substrat, oligomérisation du répresseur...).

## P11

**Arthropod-Derived Histamine Binding Protein Prevents Murine Allergic Asthma**

Isabelle Couillin<sup>\*†</sup>, B. Boris Vargaftig<sup>¶</sup>, Muazzam Jacobs<sup>+</sup>, Guido C. Paesen<sup>§</sup>, Patricia Nuttall<sup>§</sup>, Isabelle Maillet<sup>\*†</sup>, Jean Lefort<sup>¶</sup>, René Moser<sup>+</sup>, Wynne Weston-Davies<sup>‡§</sup>, and Bernhard Ryffel<sup>\*</sup>

*\*CNRS Institute Transgenose, Orleans, France,*

*†Key-Obs S. A., Orleans, France*

*‡Evolutec Ltd. Oxford, § Centre for Ecology and Hydrology, Oxford*

*¶Dept Pharmacology, Instituto de Ciências Biomédicas, University of, S.Paulo, Brazil*

Since histamine receptor type I blockade attenuates allergic asthma, we asked whether complete neutralisation of histamine by an arthropod-derived, high affinity histamine binding protein (EV131) would prevent allergic asthma. Intranasal administration of EV131 given prior to antigen challenge in immunised mice prevented airway hyperreactivity by 70%, abrogated peribronchial inflammation, pulmonary eosinophilia, mucus hypersecretion and IL-4 and IL-5 secretion. Saturation with histamine abrogated the inhibitory effect of EV131 on bronchial hyperreactivity. The inhibitory effect of EV131 on bronchial hyperreactivity was comparable to that of glucocorticosteroids. These results demonstrate that histamine is a critical mediator of allergic asthma. Therefore, complete neutralisation of histamine, rather than specific histamine receptor blockade, may have a profound effect on allergic asthma.

## P12

## Etude fonctionnelle des phosphatidyl ethanolamines binding protein (PEBP) chez *Drosophila melanogaster*.

Decoville Martine, Aurélie Gombault, Aurélien Rappailles et Daniel Locker

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 et affiliée à l'INSERM

Initialement mises en évidence dans le cerveau de bœuf (Bernier et Jolles 1984), les PEBP constituent une famille de protéines largement répandues dans de nombreuses espèces. Ces protéines semblent impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que la croissance et la morphogénèse cellulaire et tissulaire. Chez les mammifères 2 rôles principaux ont actuellement été décrits : rôle inhibiteur de la voie des MAP kinases Raf/MEK/ERK d'où leur second nom RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein) et des protéases à sérine. Cette fonction d'inhibiteur se fait grâce à l'interaction directe de la PEBP avec ses protéines cibles. De manière à préciser les différentes fonctions des protéines PEBPs, un modèle drosophile a été développé. Le séquençage de son génome a permis d'identifier 6 gènes putatifs codant les PEBPs répartis sur les chromosomes II et III. Au début de ce travail aucun résultat n'était connu sur les PEBP de drosophile.

Nous avons dans un premier temps caractérisé le profil d'expression de deux de ces gènes (CG7054 et CG18594). De nos résultats il ressort :

- 1) Que ces phases de lecture putatives correspondent bien à des gènes exprimés de drosophile
- 2) Que l'expression de ces gènes est régulée dans l'espace et le temps. En effet nous observons par la technique d'hybridation *in-situ* la présence de l'ARNm que dans certain tissus : ovaires, disques imaginaux et embryon précoces.
- 3) Que les deux gènes étudiés, qui sont adjacents sur le chromosome III, présentent le même profil d'expression.
- 4)

Dans un deuxième temps nous avons par mutagénèse avec l'élément transposable P induit plusieurs mutants pertes de fonction du gène CG 18594. Le phénotype de ces mutants est très pléiotrope. Il affecte principalement la viabilité, la fertilité et la morphologie de l'abdomen. Enfin, nous avons construit des lignées permettant la sur-expression d'un gène PEBP (CG18594).

Bernier I, Jolles P. Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta*. 1984 23;790(2):174-81.



## P13

### Expression and role of the AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rat ovary and pituitary

Joëlle Dupont

Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37 380 Nouzilly

The AMP-activated protein kinase (AMPK) is a critical regulator of energy metabolism. The AMPK is a heterotrimeric enzyme consisting of catalytic  $\alpha$  subunit and two regulatory subunits ( $\beta$  and  $\gamma$ ). It is activated in response to ATP depletion, which causes a concomitant increase in the AMP/ATP ratio. Once activated, AMPK phosphorylates several downstream substrates to switch off ATP-consuming pathways (fatty acid synthesis and cholesterol synthesis) and to switch an ATP generating pathways (fatty acid oxidation and glycolysis). Its role in muscle, liver or adipose tissue is well known whereas its expression and function have not yet investigated in tissue involved in the reproduction including ovary and pituitary. By RT-PCR and western-blot, we have shown that the  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunits mRNA and protein are expressed in the rat ovary and pituitary. Furthermore, in primary rat pituitary and granulosa cells, we have observed that AICAR (5-amino-imidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside, 1 mM) treatment, a well known activator of AMPK, for 24h or 48h increased the phosphorylation of AMPK $\alpha 1$  on Thr 172. Interestingly, AICAR treatment for 48h reduced by two-fold the progesterone secretion in basal state and in response to IGF-1 and FSH in rat granulosa cells. Furthermore, we have shown that this decrease in progesterone secretion in response to AICAR was due to a reduction by two-fold in the 3  $\beta$ HSD protein expression. AICAR treatment did not modify the protein expression of p450scc. In rat granulosa cells, IGF-1 and FSH are known to activate different signalling pathways including the MAPK (ERK1/, p38, JNK) and the PI3K/Akt pathways. We have observed that AICAR treatment reduced by two-fold the MAPK ERK1/2 phosphorylation in basal state and in response to IGF-1 and FSH. It's well known that the MAPK ERK1/2 is involved in the steroidogenesis in rat ovary. Thus, we can hypothesize that AICAR treatment reduced the 3  $\beta$ HSD protein expression and consequently progesterone secretion through a reduction in ERK1/2 phosphorylation. We are testing this hypothesis by using pharmacological inhibitors and the siRNA technology. Taken together, we showed for the first time that AMPK is expressed and functional in rat ovary and pituitary. In ovary, it may be involved in the steroidogenesis. The role of AMPK in pituitary is testing.

Key words: ovary, energy metabolism, rat, pituitary, steroidogenesis

## P14

### **Relationship between glutamine synthetase activity and epilepsy. Myth or reality? A study conducted with a murine model and various glutamine synthetase inhibitors**

EL WAFI, M., LAPOUBLE, E., GEFFLAUT, T.\* , BOLTE, J.\* , RICHARD, O., PICHON, J. & MONTECOT-DUBOURG, C.

Neurobiology Laboratory, UPRES 2633, Department of Biology, University of Orléans

\*SEESIB, CNRS UMR 6504; Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand

Glutamine synthetase (GS) is an ubiquitous enzyme in both eukaryotes and prokaryotes that catalyses the conversion of glutamate to glutamine, a central reaction in nitrogen metabolism. In the central nervous system (CNS) of vertebrates this enzyme plays a pivotal role in the glutamic homeostasis. Thus it is conceivable to postulate that alterations of its activity could lead to various neurological disorders such as cortical or hippocampal epilepsies.

In the present study we used several drugs commercially released as GS inhibitors : phosphinothricin (PPT), monomethyl mercury (MM) and alpha aminoadipic acid (AAA). We also used the PPT derivative N-acetyl-PPT (NAPPT) which is no longer a GS inhibitors, at least in plants.

Here we show that PPT, MM and NAPPT efficiently inhibit purified GS from *E. coli*, whereas AAA has no inhibitory effect at all. All this is also true with homogenates obtained from brain cortex, cerebellum and liver of C57BL/6J mice and incubated with each different inhibitors.

Results are quite different when homogenates came from acutely ip-pretreated mice with either PPT, MM or NAPPT.

Under these conditions, GS activities of cortical, cerebellum or liver homogenates, coming from PPT pretreated mice, are not significantly different of that of untreated mice. This is in agreement with previous results obtained by E Lapouble (Ph. D. thesis). But GS activity is drastically lowered in a cortical homogenate obtained from NAPPT pretreated mice, with a residual activity of 20 to 30%. However, within the same mice, the inhibitory effect is weak in cerebellous and hepatic tissues. On the other hand, MM is a very efficient inhibitor of cortical and cerebellous GS, but it has almost no effect on hepatic GS.

Electroencephalographic (EEG) and behavioural studies were performed with inhibitor treated mice. Five hours after one ip injection of PPT, 75 mg/kg, a typical EEG is obtained, characteristic of an epileptic state. Concomitantly to the EEG panel, mice developed typical motor seizures. Under the same conditions, NAPPT, 100 & 150 mg/kg, does not induce any EEG modifications. The overall aspect of the EEG is quite similar to the basal EEG with, however, an enlargement of the signal. There is no behavioural modifications after NAPPT treatment. On the other hand, MM does not induce any modifications of either EEG or behaviour.

In summary our results show that i) PPT induces seizures without inhibition of GS. ii) NAPPT and MM inhibit GS but do not trigger epileptic crisis.

These observations strongly suggest that, in our conditions and with the experimental model used, there is no correlations between GS inhibition and development of epileptic seizures.

## P15

**Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88**

Fremont, Cecile M.<sup>1,4</sup>, Yermeev, Vladimir<sup>1,3,4</sup>, Nicolle, Delphine M.<sup>1</sup>, Jacobs, Muazzam<sup>2</sup>, Quesniaux, Valerie F.<sup>1</sup> and Ryffel, Bernhard<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup> CNRS, Molecular Immunology and Embryology, 45071 Orleans, France

<sup>2</sup> Department of Immunology, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

Toll-like receptors (TLR) such as TLR2 and TLR4 have been implicated in host response to mycobacterial infection. Here, mice deficient in the TLR adaptor molecule myeloid differentiation factor 88 (MyD88) were infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). While primary MyD88<sup>-/-</sup> macrophages and dendritic cells are defective in TNF, IL12 and nitric oxide production in response to mycobacterial stimulation, the upregulation of costimulatory molecules CD40 and CD86 is unaffected. Aerogenic infection of MyD88<sup>-/-</sup> mice with MTB is lethal within 4 weeks with 2 log higher CFU in the lung, high pulmonary levels of cytokines and chemokines, and acute, necrotic pneumonia, despite a normal T cell response with IFN $\gamma$  production to mycobacterial antigens upon ex vivo restimulation. BCG vaccination conferred a substantial protection in MyD88<sup>-/-</sup> mice from acute MTB infection. These data demonstrate that MyD88 signalling is dispensable to raise an acquired immune response, which however is not sufficient to compensate the profound innate immune defect of MyD88<sup>-/-</sup> mice to control MTB infection.

## P16

## INFLUENCE DE DIFFERENTS ELICITEURS SUR LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES DE DIVERS EXPLANTS D'*Hypericum perforatum* L. CULTIVES *in vitro*

Gadzovska Sonja<sup>1,2</sup>, Maury Stéphane<sup>1</sup>, Hano Christophe<sup>3</sup>, Lamblin Frédéric<sup>3</sup>, Spasenoski Mirko<sup>2</sup>, Joseph Claude<sup>1</sup>, Hagège Daniel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, UFR-Faculté des Sciences, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans, Cedex, France. [sonja.gadzovska@univ-orleans.fr](mailto:sonja.gadzovska@univ-orleans.fr). <sup>2</sup> Institut de Biologie, Faculté des Sciences, Université "Ss. Cyril et Methodius" de Skopje, Archimedova 5, BP 162, 1000 Skopje, Macédoine. <sup>3</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres, 21 rue Loigny La Bataille, UFR-Faculté des Sciences, Université d'Orléans, 28000 Chartres, France.

Les métabolites secondaires apparaissent comme des substances de signal et de défense dans les interactions de la plante avec son environnement. Le terme d'éliciteur s'appliquait à l'origine aux molécules susceptibles d'induire la production de métabolites secondaires. Il est désormais communément utilisé pour désigner les composés stimulant tous les types de réaction de défense. L'acide jasmonique (AJ) et l'acide salicylique (AS) représentent dans la plante des éliciteurs de réponses aux agressions. Des mycéliums fongiques constituent, quant à eux, des éliciteurs parce qu'ils sont capables d'engendrer des synthèses *de novo* de phytoalexines, substances antimicrobiennes.

L'objectif de notre démarche a été d'étudier les effets de plusieurs éliciteurs sur la production de métabolites secondaires dans des pousses, des cals et des suspensions cellulaires d'*Hypericum perforatum* cultivés *in vitro*. Pour savoir si la production de métabolites secondaires pouvait être modifiée en culture *in vitro*, AJ, AS et des extraits de mycéliums de *Fusarium oxysporum*, de *Phoma exigua* et de *Botrytis cinerea* ont été utilisés comme éliciteurs. L'évolution des teneurs en divers métabolites secondaires (composés phénoliques totaux, les flavonoïdes, les flavonols, les anthocyanes, l'hypéricine et la pseudohypéricine) a été suivie. Par ailleurs, les activités de deux enzymes clés des métabolismes des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes ont également été mesurées. Ainsi, celle de la phénylalanine ammonia lyase (PAL) et celle de la chalcone isomérase (CHI) ont été déterminées pour tenter d'apprécier les liens éventuels entre les voies métaboliques.

Nos résultats montrent que les teneurs en métabolites secondaires sont globalement plus élevées dans les pousses que dans les cals ou les cellules en suspension. Ainsi, dans les pousses, l'AJ stimule les productions d'hypéricine et de pseudohypéricine. En revanche, il n'influence ni les autres teneurs en métabolites secondaires ni les activités de la PAL ou de la CHI. C'est pourquoi, il apparaît possible d'envisager la production d'hypéricine et de pseudohypéricine à l'échelle industrielle via la culture *in vitro*.

## P17

**A NEW POTENT BRADYKININ-DEGRADING ENZYME: CATHEPSIN K**

Emmanuel Godat<sup>1</sup>, Fabien Lecaille<sup>1</sup>, Claire Desmazes<sup>1</sup>, Dieter Brömme<sup>2</sup>, Christophe Vandier<sup>3</sup>, and Gilles Lalmanach<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U 618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Université François Rabelais, Tours, France;

<sup>2</sup> Department of Human Genetics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA; <sup>3</sup> INSERM EMI-U 0211, Université François Rabelais, Tours, France

Phone : + (33) 2 47 36 61 51; Fax: + (33) 2 47 36 60 46 ; E-mail: [gilles.lalmanach@univ-tours.fr](mailto:gilles.lalmanach@univ-tours.fr)

Kinins are generated from kininogens by kallikreins and their amount regulated by kininases. Their pharmacological effects are mediated either by inducible or constitutive kinin receptors. Kinins are implicated in inflammatory disorders, causing vasodilatation and contraction of smooth muscles; they also stimulate the release of nitric oxide, increase microvascular permeability, and modulate the release of histamine, superoxide radicals, and pro-inflammatory cytokines.

We have shown that cathepsin K, but not cathepsins B, H, L, and S, cleaved kinins at the Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup> bond (1). Taking into account the report of an unidentified kinin-metabolizing enzyme from macrophages, the ability of this cysteine protease to act as a physiologically relevant kininase have been further investigated. Wild-type fibroblast lysates from mice, by contrast with cathepsin K-deficient lysates, hydrolyzed bradykinin (BK), and released two metabolites, BK(1-4) and BK(5-9). Cathepsin K cleaved the bradykinin-mimicking substrate Abz-RPPGFSPFR-(3-NO<sub>2</sub>-Tyr) more efficiently ( $k_{cat}/K_m = 12\ 500\ \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) than ACE hydrolyzed BK. Kininase activity was further evaluated on bronchial smooth muscles. BK induced a dose-dependent contraction, which was abolished by Hoe140, a B2-type receptor antagonist. Addition of cathepsin K impaired BK-dependent contraction of normal and chronic hypoxic rats, while cathepsins B and L did not. Taking together vasoactive properties of kinins and the potency of cathepsin K to modulate BK-dependent contraction of smooth muscles, present data support that cathepsin K may act as a kininase, a unique property among mammalian cysteine proteases, that may exert beneficial effects in airway bronchoconstrictive diseases (2).

1 - Desmazes, C., Galineau, L., Gauthier, F., Brömme, D. and Lalmanach, G. (2003)  
*Eur. J. Biochem.* 270, 171-8

2 - Godat, E., Lecaille, F., Desmazes, C., Duchêne, S., Weidauer, E., Saftig, P., Brömme, D., Vandier, C. and Lalmanach, G. (2004)  
*Biochem. J.* in press (DOI:10.1042/BJ20040864)

## P18

## EFFET DU FROID SUR L'APTITUDE A FLEURIR D'UNE PLANTE DE GRANDE CULTURE : ROLE DE LA METHYLATION DE L'ADN

Kamiri Mourad<sup>1</sup>, Causevic Adisa<sup>1</sup>, Delaunay Alain<sup>1</sup>, Hagège Daniel<sup>1</sup>, Marc Lefebvre<sup>2</sup>, Maury Stéphane<sup>1</sup>.

1- Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Fac. Sciences, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans Tel / Fax : 02 38 49 47 21. [stephane.maury@univ-orleans.fr](mailto:stephane.maury@univ-orleans.fr). 2- ADVANTA-SES-EUROPE, 3300 Tienen, Industriepark, Soldatenplein Z2 nr.15 Belgique.

Le séquençage du génome de divers organismes a permis d'entrer dans l'ère de la génomique fonctionnelle qui s'intéresse en particulier aux mécanismes de régulation de l'expression du génome. Les mécanismes épigénétiques (modifiant le phénotype sans altérer le génotype) participent à ce contrôle par le biais de modifications de la structure de la chromatine. La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique qui correspond à l'addition d'un groupement méthyle sur le carbone 5 des résidus cytosine situés en particulier aux niveaux des îlots CpG présents dans la moitié des gènes. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes : les ADN méthyltransférases. L'importance de la méthylation de l'ADN a été démontré à travers divers exemples tels que les syndromes ICF et Rett ou certains cancers chez l'Homme, mais également chez les plantes dans le contrôle de la floraison et donc de la reproduction. De nombreuses plantes d'intérêt économique telles que le blé et la betterave sucrière nécessitent une période de froid hivernal pour fleurir (on parle de vernalisation). Il a été montré chez la plante modèle *Arabidopsis* que la vernalisation induisait une déméthylation de l'ADN qui déclenchait la floraison. Les loci cibles de cette déméthylation sont encore peu connus.

Notre équipe s'intéresse à la vernalisation chez plusieurs génotypes de betterave sucrière en collaboration avec la société semencière ADVANTA. Aucune étude du contrôle épigénétique de la vernalisation n'a jamais été menée sur cette plante de grandes cultures (cultivée en Région Centre sur 45 000 ha avec les meilleurs rendements en sucre de toute la France, et exploitée par 5 sucreries). Diverses techniques permettent d'étudier la méthylation de l'ADN. Certaines déterminent le pourcentage total de cytosine méthylée (HPLC), d'autres permettent de savoir si une séquence donnée est méthylée ou non (Southern blot, PCR bisulfite). La technique de "Restriction Landmark Genome Scanning" (RLGS) permet d'étudier l'état de méthylation de plus de 1000 îlots CpG en une seule fois sans aucune connaissance préalable de la séquence des gènes. C'est une séparation bidimensionnelle par électrophorèse de fragments d'ADN radiomarqués en un millier de spots. Ceux-ci ont une forte probabilité de contenir un gène et sont de taille idéale pour le clonage et le séquençage. Les premiers résultats utilisant ces techniques et concernant l'étude du contrôle épigénétique de la vernalisation chez la betterave sucrière seront présentés. En particulier, un lien entre le taux de méthylation de l'ADN et la sensibilité génotypique à la vernalisation a été mis en évidence. La technique de RLGS devrait permettre d'identifier des loci cibles de la déméthylation de l'ADN lors de la vernalisation.

## P19

**Modulation du routage intracellulaire du récepteur FSH**

**E. Kara**, S. Marion, F. Guillou, P. Crépieux, E. Reiter

UMR INRA-CNRS-Univ. Tours-Haras Nationaux, PRC, Equipe " Mécanismes d'action des Gonadotropines ", 37380 Nouzilly

La FSH transduit ses effets *via* un récepteur à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (R7TM). Dans l'organisme, les cellules cibles de la FSH sont continuellement exposées à l'hormone, d'où l'importance des mécanismes de désensibilisation. Des travaux menés *in vitro* ont montré le rôle central des  $\beta$ -arrestines dans la désensibilisation du R-FSH (1). Pour les R7TMs en général, selon l'affinité du récepteur vis-à-vis des  $\beta$ -arrestines 1 et 2 et la durée du trafic intracellulaire, on distingue deux classes de récepteurs, A et B. De plus, une autre caractéristique qui différencie ces deux classes est la présence d'un motif riche en Ser/Thr localisé dans la partie C-terminale des récepteurs de classe B qui serait impliqué dans la liaison aux  $\beta$ -arrestines et dans la durée du trafic intracellulaire (2).

Afin d'étudier le rôle de la région riche en Ser/Thr présente dans l'extrémité C-terminale du R-FSH, nous avons modifié par mutagenèse dirigée les acides aminés qui la constituent. Les premières études montrent une plus forte production d'AMPC sous stimulation FSH par le R-FSH muté par rapport au R-FSH sauvage (wt), pour un niveau égal d'expression à la membrane plasmique. De plus, la mutation confère au R-FSH une cinétique d'internalisation différente de celle du R-FSH wt. En effet, des mesures d'internalisation par liaison sur cellules vivantes ont montré que la proportion de récepteurs internalisés est plus faible pour le R-FSH muté par rapport au R-FSH sauvage. Pour comparer l'affinité des deux récepteurs vis-à-vis des  $\beta$ -arrestines 1 et 2, des études par différentes techniques (microscopie confocale, co-immunoprécipitation,...) sont en cours.

Par conséquent, suite à la stimulation par l'hormone, le récepteur muté est présent à la membrane plasmique en plus forte proportion que le récepteur wt. De ce fait, il pourrait stimuler l'adénylate cyclase plus efficacement, d'où une plus forte production d'AMPC. Une autre hypothèse est qu'un changement de conformation du récepteur muté permettrait un couplage plus efficace à  $G\alpha_s$ .

(1) Troispoux C., *et al.*, (1999) *Mol. Endo.* **13**, 1599-1614

(2) Oakley R.H., *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19452-19460

**P20****AUTOMATED BLOOD SAMPLING FROM AWAKE LABORATORY ANIMALS COUPLED TO 96-WELL SAMPLE PREPARATION TOOLS AND LC/MS-MS**

C.B. Kissinger, P.T. Kissinger, R.J. Hilt, Y. Zhu  
Bioanalytical Systems, Inc. West Lafayette, Indiana 47906-1382, USA

M. Parrod, P. Cochet, N. Bromet  
Biotec Centre, 45100 Orléans-La-Source, France

- The preclinical bioanalytical process with animal models begins with sampling biological fluids and tissue. The goal is to understand such topics as oral absorption kinetics, distribution, metabolism, excretion, blood brain barrier penetration, drug-drug interactions, and the influences on biomarkers, hematology, electrophysiology, cardiology, blood pressure and behaviour. More often, a quick look is obtained by periodic blood sampling of 8-12 samples over a total time span of 10-24 hours. Urine, feces may be collected too.
- Nowadays, rapidity of preclinical studies are processing by high throughput and samples are submitted to a robotic sample extraction (i.e. SPE) coupled to LC/MS-MS or RIA/EIA. These methodologies of ADME allow to reduce the number of animals and enhance animal comfort (avoid of anaesthesia for blood sampling).
- Here is presented an application of rat pharmacokinetic, nevertheless this approach can be applied to higher animals such as dog and primates as well as smaller animals like mouse if the reduced volume of blood which can be taken may be suitable to the analytical methodology.



## P21

## **PAPRICA : Pollution Aérienne et Pathologie Respiratoire : Impact de la Communication sur l'Air**

Sandrine LACOUR, Valérie LEBLOND, Sandrine LE GUELLEC, Michèle DE MONTE, Patrice DIOT

INSERM U.618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires. Equipe « Aérosols et Cancer Broncho-pulmonaire »  
Faculté de Médecine – 2 bis boulevard Tonnellé – 37032 TOURS cedex

Gaz oxydant puissant, l'ozone est l'un des principaux polluants de l'air. La loi sur l'air de 1996 définit le seuil d'information du public à  $180 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$ . Cependant, plusieurs études ont montré que l'ozone a des effets nocifs sur la santé des personnes fragiles sur le plan respiratoire à partir d'une concentration de  $110 \mu\text{g}/\text{m}^3$  prolongée pendant au moins 8 heures. Le réseau PAPRICA, piloté par l'unité INSERM 618, regroupe différents partenaires de la région Centre concernés par la pollution atmosphérique et son impact sur la santé : l'ARAIR Centre, Respir' 37, la DRSM Centre, la MSA, le CHRU de Tours, Lig'Air, l'INERIS, Nature Centre, la DRIRE, la DRASS, l'ORS, la ville de Tours et la Région Centre. Il est destiné à tester l'hypothèse qu'une information anticipée des dépassements du seuil de  $110 \mu\text{g}/\text{m}^3/8\text{h}$  d'ozone dans l'air pourrait être bénéfique à la santé de personnes atteintes d'insuffisance respiratoire chronique sévère. Pour l'année 2003, 112 patients appareillés par l'ARAIR Centre dont 11 enfants ont accepté de participer à l'étude PAPRICA. Nous avons constitué 2 groupes comparables de patients en terme de pathologie et d'appareillage. La prévision des dépassements du seuil de  $110 \mu\text{g}/\text{m}^3/8\text{h}$  d'ozone dans l'air résulte d'une collaboration entre Lig'Air et l'INERIS et s'est déroulé entre le 26 juin 2003, date de la mise en service de la plate-forme de modélisation PREV' AIR par l'INERIS et le 30 septembre 2003, fin de la période pendant laquelle on peut observer des dépassements de ce même seuil. Avec 83,1 % de bonne prévision, le bilan de cette première année est satisfaisant. Lors de la prévision d'un dépassement du seuil de  $110 \mu\text{g}/\text{m}^3/8\text{h}$  d'ozone dans l'air pour le jour suivant, un message d'alerte est envoyé à la moitié des patients (groupe 1). Ces patients ont reçu au début de l'étude une notice leur donnant des conseils d'hygiène de vie à suivre pour se prémunir d'une exposition à cette pollution lors de ces périodes d'alerte. Le groupe 2 (témoin) ne reçoit pas cette information. Au cours de l'été 2003, les patients du groupe 1 ont reçu 8 messages d'alerte, 36 messages de maintien d'alerte et 8 messages de fin d'alerte. Nous analysons actuellement l'impact de notre stratégie de communication d'une part en terme de consommation de médicaments, de consultations, et d'hospitalisations à partir des données extraites des bases de la DRSM et de la MSA, et d'autre part en terme d'état de santé et de qualité de vie à partir des réponses aux questionnaires qu'ils ont reçus au début de l'étude. Les résultats préliminaires indiquent que les patients ont eu moins de symptômes respiratoires, ont moins consommé de médicaments et ont moins fait appel aux professionnels de santé lorsqu'ils ont été informés à l'avance des dépassements du seuil de  $110 \mu\text{g}/\text{m}^3/8\text{h}$  d'ozone dans l'air que lorsqu'ils ne l'ont pas été.

Cette étude nous permettra d'évaluer l'impact d'une stratégie de prévention par la communication en direction des insuffisants respiratoires afin d'argumenter les réflexions et les décisions politiques sur un sujet de santé publique d'actualité.

Cette étude est réalisée grâce aux soutiens financiers du Programme Hospitalier de Recherche Clinique Régional 2002, de la Région Centre, de l'ADEME, de l'ANTADIR, de l'ARAIR Centre.

## P22

## Bradykinin-degrading properties of cathepsin K depends on its S2 substrate specificity

Fabien Lecaille <sup>1</sup>, Emmanuel Godat <sup>1</sup>, Christophe Vandier <sup>2</sup>, Dieter Brömme <sup>3</sup>, and Gilles Lalmanach <sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U 618, Université François Rabelais, Tours, France;

<sup>2</sup>INSERM EMI-U 0211, Université François Rabelais, Tours, France; <sup>3</sup>Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA; Phone : + (33) 2 47 36 61 51 – gilles.lalmanach@univ-tours.fr

Kinins are generated from kininogens by kallikreins, and their pharmacological effects mediated either by inducible or constitutive kinin receptors. These peptides are implicated in inflammatory disorders, causing vasodilatation and contraction of smooth muscles. Their amount is regulated by kininases, which rapidly breakdown kinins to give peptidyl fragments, some of which remain pharmacologically active.

Despite the high amino acid sequence identities and structural similarities between cathepsins K and L, we have shown that cathepsin K, but not cathepsins L, cleaved kinins (1). Cathepsin K cleaved the bradykinin-mimicking substrate Abz-RPPGFSPFR-(3-NO<sub>2</sub>-Tyr) more efficiently ( $k_{cat}/K_m = 12\ 500\ \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) than ACE hydrolyzed bradykinin (BK). Conversely Abz-RPPGFSPFR-(3-NO<sub>2</sub>-Tyr) was not cleaved by a S2 cathepsin L-like cathepsin K mutant, suggesting that kinin-degrading properties of cathepsin K depends on P2/S2 interactions. To further investigate this hypothesis, we have engineered the S2 pocket of human cathepsin L into a cathepsin K-like subsite. The S2 cathepsin K-like cathepsin L mutant, but not its parent enzyme, may hydrolyze kinins at the same cleavage site than wild recombinant cathepsin K.

Kininase activity was further evaluated on bronchial smooth muscles. BK induced a dose-dependent contraction, which was abolished by Hoe140. Cathepsin K and the S2 cathepsin K-like cathepsin L mutant impaired bradykinin-dependent contraction of rat bronchial smooth muscles, while cathepsin L and the S2 cathepsin L-like cathepsin K mutant did not (Lecaille et al., manuscript in preparation).

(1) Godat, E., Lecaille, F., Desmazes, C., Duchêne, S., Weidauer, E., Saftig, P., Brömme, D., Vandier, C. and Lalmanach, G. (2004) *Biochem. J.* in press (DOI:10.1042/BJ20040864)

## P23

**FSH activates p70 S6 kinase by protein kinase A-mediated dephosphorylation of Thr421/Ser424 and modulates mRNA translatability in differentiated primary Sertoli cells**

Charlotte Lécureuil, Sophie Tesseraud\*, Elodie Kara, Nadine Martinat, Amina Sow, Isabelle Fontaine, Christophe Gauthier, Eric Reiter, Florian Guillou, Pascale Crépieux

Laboratoire de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique/Centre National pour la Recherche Scientifique/Université de Tours/Haras Nationaux, UMR 6175, and \*Recherches Avicoles, Centre de Recherches de Tours, 37380 Nouzilly, France.

Follicle-stimulating hormone (FSH) is a major hormonal input which drives Sertoli cells to their fully differentiated function in male reproduction. It is a physiologically important issue to define how FSH mediates its effects at the cellular level to regulate gene expression. Here, we addressed whether FSH was involved in the translational control of different mRNA species, in primary cultures of Sertoli cells isolated from 19-day old rats. By polysome sub-fractionation, we found that FSH enhanced the recruitment of the transferrin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAs to the poly-ribosomes, but not of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) nor of the elongation factor eEF2 mRNA. Furthermore, FSH stimulation led to phosphorylation of the S6 ribosomal protein and enhanced p70 S6 kinase activity. Surprisingly, p70 S6 kinase was constitutively phosphorylated on Thr 389, in a manner sensitive to phosphatidylinositol (PI)-3 kinase and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors. We show that FSH stimulated p70 S6 kinase enzymatic activity by dephosphorylating the Thr421/Ser424 residues located in the auto-inhibitory domain, in a manner dependent on PKA. In addition, the transferrin level was decreased by the same pharmacological inhibitors that prevented FSH-stimulated S6 phosphorylation. In summary, these results show that FSH modulates translation and triggers unexpected regulations of p70 S6 kinase by dephosphorylation of Thr421/ Ser424 mediated by PKA, to induce S6 phosphorylation.

## P24

**Sélection et caractérisation d'ARN synthétiques ligands de la protéine prion ovine recombinante.**

Raphael Mercey<sup>1</sup>, Marie-Christine Maurel<sup>2</sup>, Isabelle Lantier<sup>1</sup>, Frédéric Lantier<sup>1</sup>, Daniel Marc<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pathologie Infectieuse et Immunologie et <sup>2</sup>Physiologie de la Reproduction et des Comportements,  
INRA, centre de Tours  
37380 Nouzilly

La nature exacte de l'agent infectieux responsable des Encéphalopathies Subaiguës Transmissibles (EST) demeure une énigme. Cet agent est majoritairement composé d'une protéine constitutive de l'hôte, la protéine prion (PrP) dont la conformation anormale contiendrait, selon l'hypothèse prion, toute l'information caractérisant l'agent. Jusqu'à présent, toutes les tentatives d'identification d'un acide nucléique dans l'agent se sont révélées infructueuses. Pourtant, la diversité observée des souches ainsi que le phénomène d'adaptation sont deux propriétés caractéristiques des agents infectieux conventionnels, liées à l'existence d'un acide nucléique portant une information à la fois stable et susceptible d'évoluer par mutations. En outre, la protéine prion, dont on ignore la fonction exacte, montre in vitro des propriétés de chaperone à l'égard des ARN. Pour corroborer ces observations et tenter d'élucider le rôle de PrP et la nature de l'agent, nous avons cherché à caractériser des motifs séquentiels ou structuraux permettant à des ARN de se lier à la protéine prion. Des ARN synthétiques se liant in vitro à la protéine prion recombinante ovine ont été isolés par la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment), puis clonés et caractérisés. Une collection de 119 clones, obtenus à l'issue de 3 séries indépendantes de sélection, a été constituée. La moitié des clones correspondent à des séquences retrouvées deux fois ou plus, constituant ainsi 4 groupes et 9 paires. Certains groupes distincts ont en commun des motifs de séquence similaires. Les comparaisons aux banques de séquences accessibles en ligne n'ont pas permis d'identifier ces motifs dans les génomes séquencés. Les ligands ont ensuite été classés suivant leur affinité mesurée au biacore ; le clone le plus fréquent dans la collection est également le plus affiné ( $K_d=15\text{nM}$ ). Outre l'utilisation de ces ARN synthétiques comme outil de diagnostic, cette collection de motifs est une première étape vers l'identification d'ARN ligands naturels de la PrP.

## BRAIN MICRODIALYSIS COUPLED TO BLOOD SAMPLING. APPLICATION TO THE MORPHINE DETERMINATION BY LC/MS-MS IN BOTH EXTRACELLULAR FLUID AND RAT PLASMA

L. MEUNIER<sup>1</sup>, M. PARROD<sup>1</sup>, C.B. KISSINGER<sup>2</sup>, P.T. KISSINGER<sup>2</sup>, S. LE GUEN<sup>3</sup>,  
E. GENIN<sup>4</sup>, G. PAUL<sup>4</sup>, N. BROMET<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotec Centre, Orléans, France; <sup>2</sup>Bioanalytical Systems, Inc. West Lafayette, Indiana 47906-1382 USA; <sup>3</sup>INSERM, Faculty of Pharmacy Paris 5, Paris, France; <sup>4</sup>Thermo Electron, Villebon, France & Somerset, NJ, USA

Cerebral microdialysis is the unique experimental tool for investigating the brain extracellular fluid concentration of a drug. This technique allows to estimate the drug permeability through the blood-brain barrier, the partitioning of the drug between the extracellular and intracellular fluids of the brain in the selected brain area where the microdialysis probe has been implanted and the cerebrospinal fluid disposition in the brain ventricles. This technique cannot be used at the level of high throughput screening but helps to describe a complete kinetic profile in the same animal. Brain microdialysis can be successfully applied in mice, rabbits and also for investigating the delivery of chemotherapeutic agents in human brain tumors.

Based on results already published on Blood Brain Barrier passage about morphine and morphine 6- $\beta$ -D-glucuronide in rat. This experiment was carried out using Culex® and Ratur® to see whether an automatic sampling on awake, non stressed, freely moving animals was easy to set up.

Animals were first submitted to vascular surgery in a femoral vein and to a probe implantation in the Striatum (AP: 1.20; L: 2; P:4). After one day to recover, 10 mg/kg morphine was administered via subcutaneous route. Infusion of Ringer like solution was carried out via syringe pump at a flow rate of 3  $\mu$ L/min. 15 samples of 30  $\mu$ L were taken over the 2.5 hour following the administration. Concomitantly, automatic blood sampling was carried out, and 11 samples of 50  $\mu$ L of blood were taken. Blood was automatically replaced by the same volume of saline, while the total volume of blood collected did not exceeded 1.5 mL (less than the 10 % of total volume). An LC/MS-MS previously published was applied on these small volumes collected and the limit of sensitivity was highly improved using TSQ Quantum equipment.

Results showed :

- there was no difficulty to manage the experiment under Culex® and Ratur® conditions, rats being in non stressed conditions,
- 100 % samples successfully collected.
- microdialysis as well as plasma concentrations are in good agreement with those already published and that on the main pharmacokinetic parameters followed namely C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC and t<sub>1/2</sub>.
- LC/MS-MS was suitable for the encountered concentrations and for the few available volume: 50  $\mu$ l on plasma, and 10  $\mu$ l on ECF.

## APPORT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF A L'ETUDE DE LA FRAGMENTATION D'ANTICORPS IgG

Olivier Michel<sup>1</sup>, Charlotte Magdelaine<sup>2</sup>, Marion Blin<sup>1</sup>, Maxime Moulard<sup>1</sup>, Michel Canton<sup>1</sup>, Hervé Watier<sup>2</sup> et [Karine Pacaud-Mercier](#)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agro-Bio, Rue Denis Papin, La Chavannerie, 45240 La Ferté Saint Aubin

<sup>2</sup> EA "Immuno-Pharmaco-Génétique des Anticorps thérapeutiques", Université de Tours, 2 bis, Boulevard Tonnellé, 37032 Tours

Au cours des années 1950, les travaux sur la fragmentation enzymatique des immunoglobulines par la papaïne puis la pepsine ont permis des avancées majeures dans la compréhension de la structure des anticorps. Ces digestions sont depuis devenues des standards en immunologie, et elles sont encore très largement pratiquées pour la préparation de biopharmaceutiques et celle de réactifs quand il s'agit de limiter les fixations non spécifiques des anticorps par leur région Fc. De nombreux facteurs comme l'espèce et l'isotype de chaîne lourde peuvent influencer ces digestions enzymatiques, expliquant parfois la résistance ou l'excessive sensibilité à la fragmentation de certains anticorps. Malgré la banalité de ces techniques, des mises au point sont donc régulièrement nécessaires. L'explosion des anticorps recombinants thérapeutiques d'une part, et le développement des approches de protéomique à haut débit d'autre part, offrent l'occasion de mieux analyser les sites de clivages.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a donc été appliquée à l'analyse de la cinétique de fragmentation par la papaïne de deux anticorps monoclonaux, l'un murin (IgG1 $\kappa$ ) comme modèle de réactif de laboratoire, l'autre chimérique homme-souris (IgG1 $\kappa$ , domaines constants humains et domaines variables murins), l'infliximab (Remicade<sup>®</sup>), représentatif des anticorps thérapeutiques. Les conditions de fragmentation ont été adaptées à l'étude par spectrométrie de masse. Les anticorps ont été dialysés contre un tampon volatil puis concentrés. La cinétique de fragmentation a été suivie toutes les 30 minutes. L'échantillon a été déposé co-cristallisé avec la matrice sur la cible puis analysé. Pour chaque anticorps, deux pics ont été observés, correspondant aux fragments Fab et Fc. Les résultats ont été confirmés par gel 1D, digestion in-gel et analyse des peptides par spectrométrie de masse.

**Ainsi, la spectrométrie de masse permet de suivre la cinétique de fragmentation des anticorps et de déterminer rapidement les conditions optimales et spécifiques de fragmentation.**

## P27

## ADAPTATION À LA SÉCHERESSE CHEZ LE PEUPLIER: BASES GÉNÉTIQUES DE LA PRODUCTIVITÉ ET DE LA DISCRIMINATION ISOTOPIQUE VIS-À-VIS DU CARBONE.

**Monclus, Romain**<sup>1</sup>, **Bastien, Catherine**<sup>2</sup>, **Brignolas, Franck**<sup>1</sup>, **Delmotte, Francis M.**<sup>1</sup>, **Dreyer, Erwin**<sup>3</sup>, **Villar, Marc**<sup>2</sup>, and **Jorge, Véronique**<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France*

<sup>2</sup>*Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, INRA Orléans, BP20619, Ardon 45166 Olivet Cedex, France*

<sup>3</sup>*UMR INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières, INRA Nancy, 54380 Champenoux, FRANCE*

Le peuplier (*Populus* spp.) fait partie des arbres les plus productifs des régions tempérées, mais son niveau de productivité est intimement lié à la disponibilité en eau du sol. L'extension de la populiculture des zones alluviales aux zones hors vallées où la disponibilité en eau est plus aléatoire, nécessite aujourd'hui des hybrides pour lesquels le niveau de productivité est affecté dans une moindre mesure par des teneurs en eau du sol limitantes. Autrement dit, nous recherchons des hybrides capables d'intégrer le carbone à moindre coût en eau. Cette aptitude est appréciée par l'efficacité d'utilisation de l'eau (en anglais Water Use Efficiency, WUE), définie, au niveau plante entière par le rapport (gain de biomasse) / (eau consommée). WUE peut également être directement et ponctuellement estimé au niveau des feuilles par le rapport (assimilation nette de CO<sub>2</sub>) / (conductance stomatique). Enfin, WUE peut être estimé indirectement, à l'échelle de la vie de la feuille, par la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone ( $\Delta$ ).

Dans l'objectif de caractériser les régions du génome impliquées dans le contrôle de la productivité et de  $\Delta$ , nous avons travaillé à partir d'une famille de peupliers issue du croisement *P. deltoides* x *P. trichocarpa* et qui compte 336 F<sub>1</sub> (environ 720 marqueurs moléculaires localisés sur deux cartes génétiques). L'expérience a été réalisée en pépinière à partir d'arbres d'un an plantés en dispositif mono-arbre en 5 blocs complets randomisés. La productivité,  $\Delta$ , la surface massique des feuilles (SLA) et leur teneur en azote et en carbone ont été mesurés sur la famille complète. Les premiers résultats montrent qu'il existe une variabilité significative pour tous les paramètres. Les clones productifs se caractérisent par un faible  $\Delta$  ce qui pourrait traduire une forte efficacité d'utilisation de l'eau et par des feuilles à SLA bas, c'est à dire des feuilles denses et/ou épaisses. Par une approche QTLs (Quantitative Trait Loci), nous avons pu mettre en évidence de nombreuses régions du génome impliquées dans la variabilité de nos paramètres ; elles expliquent entre 3 et 16 % de la variabilité phénotypique.

## P28

## Chronic treatment of mice with the broad spectrum herbicide phosphinothricin : behavioural and histological studies

MONTECOT-DUBOURG, C., RICHARD, O., GEFFLAUT, T.\*, BOLTE, J.\*, RESINA, S., EL WAFI, M. & PICHON, J.

Neurobiology Laboratory, UPRES 2633, Department of Biology, University of Orléans  
 \*SEESIB, CNRS UMR 6504; Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand

Phosphinothricin is the active ingredient of a widely used herbicide which acts by inhibiting plant glutamine synthetase (GS) leading to a toxic over accumulation of  $\text{NH}_4^+$ . At the doses used for its herbicidal activity PPT should not be harmful for cattle, poultry or even human. However, effects of PPT on chronically exposed subjects, even at very low doses are not known. *In vitro* studies on developing mouse embryos in culture have already shown that 50 $\mu\text{M}$  PPT have developmental and dysmorphic effects and induce apoptosis in the neuroepithelium. Moreover, numerous transgenic crops, resistant to PPT have been engineered by transfecting plants by the *pat* or *bar* genes coding an acetyl transferase that converts PPT to N-acetyl-PPT (NAPPT). This compound is no longer an inhibitor of the plant GS. However in a separate study we show that NAPPT is able to efficiently inhibit mouse brain cortical GS *in vivo*. So it seems quite necessary to assess the effect of PPT and NAPPT on chronically treated laboratory animals.

At first we choose to treat C57BL/6J ten weeks, three times a week, with PPT 2mg/kg or NAPPT 10 mg/kg, ip.

Behavioural studies show that PPT and NAPPT treated mice has learning impairment and spatial memory troubles, although at different extent. They also display hyperactivity and equilibrium troubles without muscular strength alteration.

All these behavioural modifications suggest a possible alteration of the brain tissue at the hippocampal level. This prompts us to undertake histological studies of the hippocampus to identify possible alterations of this tissue when mice are chronically treated with PPT or NAPPT as described above.

In preliminary results obtained with PPT treated mice, hippocampus display a profound alteration with an important cellular dispersion specially within the CA1, CA2 and CA4 areas. With NAPPT treated mice we observe less severe modifications of the hippocampal tissue with mild alterations in the CA1 and CA4 areas. These results clearly show a differential pattern of neurological disorders induced by PPT or NAPPT.

Results obtained in these behavioural and histological studies strongly suggest that PPT and NAPPT are, not at all, harmless drugs and we should, in the near future, be very cautious in the use of PPT in association with PPT-resistant transgenic plants.



## P29

**Expression and regulation of the Stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 2 (SCD2) in rat ovary**

Céline Moreau, Pascal Froment, Virginie Moreau and Joëlle Dupont

Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37 380 Nouzilly

Oocytes of all mammals contain an endogenous lipid reserve including mono and polyunsaturated fatty acids. This feature reflects their ancestral origin, the yolk-rich amniote egg. Despite the significant role of the lipid reserve in cell structure and function, very few studies have provided detailed descriptions of the mono or polyunsaturated fatty acid synthesis in the ovary. Here, we have showed by RT-PCR the mRNA expression of delta 5, 6 and 9 desaturase (SCD2 and SCD1) in the rat ovary. More particularly, we have focused our study on SCD2 because of its high level of expression. By northern-blot, two transcripts (3.9 and 5.2 kb) of SCD2 mRNA were detected in the rat ovary. Furthermore, we have localized SCD2 mRNA by in situ hybridation mainly in granulosa cells of antral follicles, the cumulus oophorus (granulosa cells around the oocyte) and the corpus lutea. Interestingly, no SCD2 expression was observed in primordial follicles and oocytes. Moreover, we have determined the SCD2 mRNA expression in vivo in rat ovary during an artificially induced ovulatory cycle by using PMSG/hCG treatment on immature 22-day old rats. After PMSG injection for 48h, the level of SCD2 mRNA in the ovary increased by 4 fold as compared to those observed in the ovary of untreated rat. Furthermore, this effect was enhanced with the hCG treatment for 48h. Interestingly, these changes of SCD2 mRNA were correlated with those observed for the StAR protein. We have also determined the SCD2 mRNA expression in the corpus lutea during the gestation in rat. We have shown a marked decrease in the SCD2 mRNA expression at day 15 of gestation, which is parallel to a fall of the progesterone secretion. To investigate the molecular mechanisms involved in the SCD2 mRNA regulation in ovary, we have performed primary culture of rat granulosa cells. These cells were stimulated for 48h with IGF-1 (10-8M) or FSH (10-8M). Northern-blot analysis revealed that both IGF-1 and FSH increased by about two fold the SCD2 mRNA expression. As previously shown, these two hormones were also able to increase protein levels of StAR and P450<sub>scc</sub> as well as the progesterone secretion. In granulosa cells, IGF-1 and FSH are known to activate different signaling pathways including the MAPK (ERK1/2, JNK, p38) and the PI3K/Akt pathways. Using specific pharmacological inhibitors we have demonstrated that the MAPK ERK1/2 pathway is involved in the IGF-1-induced SCD2 mRNA expression whereas the PI3K/Akt is involved in the FSH-induced SCD2 mRNA expression. Taken together, the delta 9 SCD2 desaturase is expressed in rat ovary and it may be involved in the regulation of follicular growth and/or the oocyte maturation.

Key words: lipid, IGF-1, FSH, rat, ovary, steroidogenesis

## P30

**MyD88 IS ESSENTIAL FOR BRONCHOCONSTRICTION AND NEUTROPHIL SEQUESTRATION IN THE LUNG**

Nicolas Noulin, Valerie J.F. Quesniaux, Isabelle Maillet, B. Boris Vargaftig, Bernhard Ryffel and Isabelle Couillin

CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) IEM 2815, Orléans, Key-Obs, Orléans, France

Aerogenic endotoxin derived from Gram-negative bacteria induces an acute respiratory distress syndrome (ARDS). Here we tested whether the adaptor molecule myeloid differentiation factor 88 (MyD88) involved in Toll-like receptor (TLR) signaling plays a role in this syndrome. We show absence of bronchoconstriction and neutrophil recruitment in MyD88<sup>-/-</sup> mice upon airway exposure to LPS. Since IL1R1<sup>-/-</sup> mice display unimpaired bronchoconstriction and neutrophil recruitment, the LPS effect seems to be mediated by TLR signaling. Using bone marrow chimaeric mice we demonstrate that non-haemopoietic cells are responsible for bronchoconstriction induced by LPS as transfer of MyD88<sup>-/-</sup> haemopoietic cells did not abrogate bronchoconstriction of irradiated wild-type recipient. Conversely, reconstitution of irradiated MyD88<sup>-/-</sup> mice with wild-type bone marrow did not correct bronchoconstriction in response to LPS. However, LPS induced TNF and IL-12 p40 secretion in the bronchoalveolar space are determined by bone marrow-derived cells. Interestingly, LPS-induced neutrophils recruitment into lungs and bronchoalveolar space occurs through MyD88 signaling in both non-haemopoietic and haemopoietic cells.

## P31

## **CANNABIS PUIS AUTRES « DROGUES » Y-A-T-IL UN RISQUE ? APPROCHE NEUROCHIMIQUE**

Aurélie OUDIN, Maÿlis DECROP, Dominique ERNOUF

Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge, 37200 TOURS

Tel : 02-47-36-71-79 , Fax : 02-47-36-71-82 , Courriel : dominique.ernouf@univ-tours.fr

Toutes les conduites addictives ont en commun la propriété de favoriser les effets de la dopamine au niveau de l'aire de récompense cérébrale, noyau accumbens et aire tegmentale ventrale. Chacune d'elles y parvient par l'intermédiaire de différents systèmes neuromédiateurs modulés par des voies souvent spécifiques dont certaines ont cependant quelques points communs.

Le cannabis renferme une soixante de cannabinoïdes dont le principal et le plus actif est le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC). Il est capable de se fixer aux récepteurs CB<sub>1</sub> centraux (et CB<sub>2</sub> périphériques). La stimulation de ces derniers entraîne des modifications neurochimiques, notamment une augmentation de la neuromédiation dopaminergique, à l'origine des effets psychoactifs du cannabis.

L'alcool, les opiacés ont quelques points communs, avec le THC, en terme d'incidence neurochimique d'où l'addition de leurs effets délétères lors de polyconsommations. Il existe, de plus, des interactions entre ces différents systèmes que ce soit par la co-localisation de leurs récepteurs ou par l'intermédiaire de neuromédiateurs communs. Tous ces phénomènes peuvent expliquer la sensibilisation croisée qui existe entre ces trois substances psychoactives (SPA) et donc le passage facile d'une SPA à une autre.

Pour le tabac, l'approche est différente puisque le cannabis est (presque) obligatoirement consommé avec du tabac. La sensibilisation à la nicotine semble, donc, plutôt être due à la co-administration de ces deux SPA qui, par ailleurs, potentialisent les phénomènes de récompense.

Enfin les relations entre la consommation de cannabis et de cocaïne ou d'ecstasy sont beaucoup moins évidentes. La sensibilisation croisée semble être, dans ce cas-là, due à la banalisation des SPA exercée par l'usage du cannabis et non aux propriétés neurochimiques voisines de ces trois SPA.

Nous concluons en rappelant qu'une addiction est une réponse individuelle à une mauvaise adaptation des circuits neuronaux lors de conditions environnementales particulières. Le point commun à toutes les conduites addictives est une stimulation dopaminergique plus ou moins directe du noyau accumbens, aire de récompense cérébrale. La consommation de cannabis n'y échappe bien évidemment pas et paraît pouvoir favoriser celles des autres SPA licites ou illicites. Parmi elles, les opiacés, l'alcool et le tabac paraissent celles qui sont le plus « à risque » du point de vue neurochimique. Précisons que l'habitude des polyconsommations et l'augmentation des quantités de THC dans les préparations de cannabis actuellement sur le marché sont aussi des facteurs indiscutables de sensibilisations croisées et que l'usage de cannabis tend à banaliser l'usage d'autres SPA. C'est pourquoi, indépendamment des effets délétères induits par sa consommation chronique, le cannabis ne devrait donc plus être assimilé à une « drogue douce » mais à une SPA capable d'initier des consommations associées aux conséquences plus graves.

## P32

## Etude de l'expression des gènes de la superfamille Thiorédoxine par PCR Quantitative dans le cancer broncho-pulmonaire

Valentine Panel<sup>1\*</sup>, Claire Desmazes<sup>1</sup>, Annick Esnard<sup>1</sup>, Serge Guyetant<sup>1/2</sup>, Frédéric Esnard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires » Faculté de Médecine, Tours

<sup>2</sup> Service d'Anatomie Pathologique, CHU Trousseau, Tours.

Le cancer bronchique est la première cause de décès par cancer chez l'homme et 22 000 des 25 000 nouveaux patients reconnus chaque année vont décéder en quelques mois. La survie à 5 ans est de 12%. Ce pronostic sombre est lié à une hétérogénéité morphologique et moléculaire, à une croissance rapide, à des symptômes tardifs et à un diagnostic clinique réalisé au stade métastatique dans 80% des cas. L'amélioration du dépistage, du pronostic et du traitement est donc un enjeu majeur de santé publique. La progression tumorale est caractérisée par la capacité des cellules à protéolyser la matrice extracellulaire et à migrer, à résister à l'apoptose et à certains agents antitumoraux ou à induire une angiogénèse. Dans chacun de ces processus, l'environnement redox joue un rôle capital. Au sein des tumeurs pulmonaires, il a été mis en évidence l'existence de modifications de l'expression de la Thiorédoxine (TRX), gène à activité redox tout particulièrement impliqué dans le métabolisme des ponts disulfure, qui confère aux cellules une capacité proliférative accrue ainsi qu'une résistance aux anticancéreux. La Thiorédoxine est la molécule de référence de cette superfamille de protéines impliquées dans la formation et le remaniement des ponts disulfure (essentiels dans différents aspects de la vie cellulaire) et à laquelle se rattachent également les Protéine Disulfure Isomérase (PDI) et les Sulfhydryl Oxydases (SOx) identifiées dans notre laboratoire. Tout laisse à penser que ces molécules agissent en réseau. L'importance de cette superfamille Thiorédoxine pour la prolifération cellulaire, et l'impact que pourraient avoir des modifications de ces gènes sur de nombreuses fonctions cellulaires, nous ont conduit à développer une étude portant sur la superfamille Thiorédoxine et les cancers broncho-pulmonaires.

Dans un premier temps, des amorces de clonage pour l'obtention de la gamme étalon et de PCR Quantitative ont été sélectionnées pour chaque gène et testées en PCR avec un gradient de température afin de déterminer les conditions optimales d'amplification (choix de la température, détermination de l'efficacité avec une matrice étalon, de la concentration des amorces et du Mg<sup>++</sup>).

Nous avons, par ailleurs, à notre disposition des biopsies de patients atteints de cancer broncho-pulmonaire provenant du service d'Anatomopathologie du CHU Trousseau-Tours. On distingue pour chaque patient, un fragment tumoral et un fragment non tumoral prélevé dans la partie adjacente. A ce jour, 50 couples d'échantillons ont été broyés afin d'en extraire les ARN qui sont ensuite rétrotranscrits en ADNc.

Nous avons pu ainsi, dans un second temps, analyser l'expression des gènes de la superfamille Thiorédoxine (TXN, PDI, Q6, SoxN) par PCR Quantitative sur ces échantillons. D'après les premiers résultats, il semblerait qu'un déséquilibre d'expression Réducteurs/Oxydants se crée dans les tumeurs.

Pour la poursuite de ce travail, nous souhaitons observer l'effet d'une surexpression des protéines de la superfamille sur la migration cellulaire. Nous souhaitons aussi localiser ces molécules dans des lignées cellulaires humaines de tumeurs pulmonaires, grâce à l'obtention de protéines chimères avec la GFP, afin d'observer des phénomènes de relocalisation ou colocalisation éventuels. Enfin, une analyse du comportement de ce réseau Thiorédoxine, lors d'une modification de l'environnement cellulaire par un stress oxydant, nous permettra de mieux comprendre le fonctionnement de ce système, dans le but de définir des cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques du cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules.

\* Bourse de Thèse financée par la Ligue Contre Le Cancer (Comité du Cher)

## P33

**ALTERED GENE EXPRESSION IN RAT MESENTERIC TISSUES FOLLOWING *IN VIVO* EXPOSURE TO A PHOSPHODIESTERASE 4 INHIBITOR**

Valérie Pawlowski<sup>1</sup>, Nicolas Daguès<sup>1</sup>, Sabrina Benabed<sup>1</sup>, David Ledieu<sup>2</sup>, Cécile Sobry<sup>2</sup>, Gilles Hanton<sup>3</sup>, Stephan Chevalier<sup>1</sup>. *PGRD Safety Sciences Europe*, <sup>1</sup>*Molecular and Cellular Toxicology*, <sup>2</sup>*Pathology and* <sup>3</sup>*Toxicology departments, Amboise, France.*

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 : [valerie.pawlowski@pfizer.com](mailto:valerie.pawlowski@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, especially 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 drugs 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. Serums were sampled for protein assays. The Affymetrix GeneChip technology, that allows one to monitor the expression of around 8,800 rat genes on an 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. Inflammation, stress response, vascular damage and energetic metabolisms figure amongst the biological mechanisms perturbed. Potential biomarkers such as Interleukin 18, Complement Component C3, Interleukin 15 and Pyruvate Carboxylase were analysed at mRNA level in mesenteric tissues by real-time RT-PCR. Interleukin 6 and Fibrinogen were analysed at both mRNA and protein level.

## P34

**EDELFOSSINE DECREASES TETRAETHYLAMMONIUM-SENSITIVE CURRENTS OF HUMAN BREAST CANCER CELL LINE MDA-MB-435S**

M. Potier, S. Roger, P. Besson, J.-Y. Le Guennec, P. Bougnoux & C. Vandier

Nutrition, Croissance et Cancer, INSERM E-0211, 2 bis Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France.

Numerous studies demonstrated that alkyl-lipid analogues such as edelfosine (1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine) have anti-tumour properties but the mechanisms of action are not elucidated. We hypothesized that edelfosine could decrease potassium currents involved in the control of cancer cells proliferation. The aim of this study is to test the effect of edelfosine on the proliferation and potassium currents of human breast cancer cell line MDA-MB-435s.

All current-clamp ( $I=0$ ) and voltage-clamp experiments were performed using whole-cell configuration of the patch clamp technique. Currents were generated by stepwise 8mV depolarising pulses (550 ms duration; 8 msec intervals) from a holding potential of -70mV to +58mV. Growth and viability of MDA-MB-435s cells were measured with the MTT tetrazolium salt assay. Cells were incubated with edelfosine for 24h or 48h and dose-response relations were established (from 0.1 to 30 $\mu$ M). Data are expressed as means $\pm$ SEM. Statistical significance ( $p$  inf. 0.05) was determined with ANOVA and *post hoc* tests.

Current-clamp experiments revealed that membrane potential of MDA-MB-435s cells was  $-44 \pm 3$ mV ( $n=24$ ). 10 mM tetraethylammonium (TEA) and 5 mM 4-aminopyridine (4-AP) decreased outward currents respectively by 55% and 33% (at +60mV). Membrane potential were depolarised respectively to  $-38.1 \pm 2.6$ mV ( $n=7$ ) and to  $-30.2 \pm 3.1$ mV ( $n=8$ ) by external applications of TEA and 4-AP. A 24h application of 1 $\mu$ M edelfosine decreased the amplitude of outward currents by 68% (at +60mV,  $n=12$ ) and depolarised membrane potential of MDA-MB-435s cells to  $-26 \pm 4$ mV ( $n=19$ ). Additional analysis showed that edelfosine significantly decreased the amplitude of TEA-sensitive currents but not of 4-AP sensitive currents ( $n=9$ ). Edelfosine decreased the proliferation of MDA-MB-435s cells with an  $IC_{50}$  of  $5.0 \pm 1.0$  $\mu$ M and of  $2.6 \pm 0.3$  $\mu$ M, respectively after 24h and 48h ( $n=3$  experiments).

The present study provides initial evidence that edelfosine decreases TEA-sensitive currents of MDA-MB-435s cells, leading to membrane depolarisation. This depolarisation could explain, in part, the anti-proliferative effect of edelfosine in MDA-MB-435s cells.

Acknowledgement : Marie POTIER holds doctoral fellowship from Ligue Nationale contre le Cancer

## P35

## Régulation par l'environnement membranaire de l'activité des P-glycoprotéines d'un nématode parasite responsables de chimio-résistance aux traitements.

M. Riou<sup>1</sup>, F. Guégnard<sup>1</sup>, Y. Le Vern<sup>2</sup>, I. Grasseau<sup>3</sup>, C. Koch<sup>1</sup>, E. Blesbois<sup>3</sup> et D. Kerboeuf<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> INRA, UR086-BioAgresseurs Santé et Environnement, Multi-résistances et Antiparasitaires Centre de recherches de Tours 37380 Nouzilly, France, <sup>2</sup> INRA, Atelier scientifique commun de Cytométrie en flux, Centre de recherches de Tours 37380 Nouzilly, France et <sup>3</sup> INRA, UR083-Recherches Avicoles, Qualité des gamètes et des embryons, Centre de recherches de Tours 37380 Nouzilly, France.

Chez les eucaryotes, les mécanismes de résistance non spécifique font intervenir le système MDR (Multi-Drug Resistance), connu par ailleurs pour induire la résistance des cellules tumorales aux anticancéreux. Ce système inclut différents composants parmi lesquels les P-glycoprotéines (P-gp) qui fonctionnent comme des "pompes" membranaires d'efflux. Chez les nématodes parasites des petits ruminants domestiques, l'efficacité des traitements anthelminthiques est aussi compromise par l'émergence de chimio-résistance faisant intervenir le système MDR. Une protéine de 170 kDa a été identifiée à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MDR1 comme une P-gp chez *Haemonchus contortus* (Kerboeuf *et al.*, 2003). Cette pompe cellulaire est fortement impliquée dans la résistance aux anthelminthiques. Chez les eucaryotes, l'activité des P-gp est conditionnée par leur environnement membranaire lipidique et, en particulier, par le cholestérol. Des résultats précédents ont montré qu'il en va de même chez les nématodes (Riou *et al.*, 2003). Le traitement des œufs d'*H. contortus* avec un capteur de cholestérol, la méthyle- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), entraîne une diminution de la teneur en cholestérol des œufs accompagnée d'une augmentation de la résistance aux anthelminthiques d'environ 23 p.100. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette modulation de résistance, des analyses directes de l'activité des P-gp ont été ici effectuées. Pour ce faire, le transport d'un substrat spécifique lipophile des P-gp, la rhodamine 123 (R123), a été estimé par cytométrie en flux. Les changements de l'environnement membranaire induits par le traitement M $\beta$ CD ont été également suivis grâce à des mesures de fluidité membranaire. Celle-ci a été évaluée après incorporation d'une sonde fluorescente dans les membranes, le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH). Selon la viscosité du milieu, la sonde pivote et la valeur d'anisotropie, inversement proportionnelle à la fluidité de la membrane, change. Chez les parasites déplétés en cholestérol, une augmentation de la fluidité de membrane a été observée ainsi qu'une diminution de l'accumulation de la R123. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour d'autres modèles eucaryotes. Ils permettent de suggérer une explication à la diminution de l'efficacité des anthelminthiques après déplétion en cholestérol. Celle-ci diminuerait l'hydrophobicité de la membrane ce qui altérerait la solubilisation des anthelminthiques ce qui conduit à une augmentation apparente de la résistance. L'activité des P-gp serait en même temps améliorée permettant ainsi une meilleure élimination des anthelminthiques et favorisant aussi l'augmentation de résistance. Le cholestérol semble donc être un modulateur de la résistance aux anthelminthiques chez les nématodes modifiant à la fois l'environnement membranaire et l'activité des P-gp.

### Références :

Kerboeuf D., Guegnard F., Vern Y.L. (2003) Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human mdr1 monoclonal antibodies. *Parasitol Res* **91**:79-85.

Riou M, Guegnard F, Le Vern Y, Kerboeuf D. (2003) Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. *J Antimicrob Chemother*, **52**(2):180-7.

## P36

**Étude comparée du développement des neurones et des astrocytes en culture.**

Robert F., Guérin M. et Hévor T.K.

Laboratoire de Neurobiologie – U.P.R.E.S. E.A. 2633, Université d'Orléans, B.P. 6759, 45067 Orléans Cedex 2 (France) - Téléphone : (33) 02 38 49 49 78 ou (33) 02 38 41 70 96. Fax : (33) 02 38 41 72 44, E-mail : [tobias.hevor@univ-orleans.fr](mailto:tobias.hevor@univ-orleans.fr) - Site Internet: [www.univ-orleans.fr/SCIENCES/neurobiologie/](http://www.univ-orleans.fr/SCIENCES/neurobiologie/)

En raison de la complexité du tissu nerveux, la culture de neurones et la culture d'astrocytes sont devenues des modèles couramment utilisés pour comprendre le rôle physiologique de chaque type cellulaire. Cependant, le développement de ces cellules hors de l'organisme n'est abordé que partiellement ou incidemment. Dans le présent travail, nous allons étudier le mode de développement des neurones et des astrocytes en culture en analysant différents paramètres de croissance et de différenciation cellulaires. Les astrocytes de rat nouveau-nés sont mis en culture dans un milieu DMEM complété par 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Les neurones sont cultivés à partir de fœtus de rat de 16 jours de gestation dans du milieu Neurobasal complété par des antibiotiques. Le nombre de neurones augmente très rapidement pour atteindre 300% d'augmentation au bout de 18 jours après la mise en culture. Ensuite, ce nombre baisse régulièrement et atteint le nombre initial de cellules mis en culture au bout de 32 jours. Cette baisse continue jusqu'à la disparition totale des neurones au bout de 50 jours. La cinétique de croissance des astrocytes est relativement différente de celle des neurones puisque, après une forte croissance cellulaire, on n'observe pas de mort cellulaire notable même après 6 mois de culture. Les modalités d'évolution de ces cellules ont été étudiées. Elles conservent leurs marqueurs spécifiques de différenciation. Les anticorps anti-neurofilaments révélant l'antigène spécifique des neurones *in vivo* marquent clairement les neurones en culture, aussi bien au niveau du corps cellulaire que des neurites. Les astrocytes sont aussi positifs à leur marqueur spécifique, la glial fibrillary acidic protein, comme les astrocytes *in vivo*. Pour expliquer la décroissance du nombre de cellules dans les phases tardives de la culture, différents paramètres d'apoptose sont analysés. Sur les cultures de neurones, une coloration au Hoescht révèle une condensation de l'ADN dans plus de 50 % des cellules mises en culture depuis au moins 25 jours et une migration de l'ADN génomique sur gel d'agarose montre une fragmentation de l'ADN dans ces cellules. Les mêmes études réalisées sur les cultures d'astrocytes ne révèlent qu'une faible proportion de cellules en apoptose (environ 4%). Ces résultats montrent que, dans nos conditions de culture, au cours de la première phase de croissance, les neurones et les astrocytes se multiplient activement sans perdre leur marqueur de différenciation. Alors que la population astrocytaire reste stable pendant au moins 60 jours, toute la population des neurones subit une apoptose rapide.



## P37

**VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNELS : INVASION ENHANCERS IN NON-SMALL CELL METASTATIC LUNG CANCER CELL LINES**S. Roger<sup>1</sup>, J. Rollin<sup>2</sup>, P. Besson<sup>1</sup>, Y. Gruel<sup>2</sup> and J.-Y. Le Guennec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nutrition, Croissance et Cancer, Inserm Emi-U 0211. <sup>2</sup> Protéases et Vectorisation pulmonaires, Equipe Aérosols et cancers Broncho-pulmonaires, Inserm U618, 2 Bd Tonnellé, 37032 Tours cedex, France.

Numerous studies have proved the involvement of ionic channels in several cancers from different origins (breast, prostate,...). They appear to participate in cancer by affecting number of biological functions, namely, regulation of cell proliferation, prevention of apoptosis and promotion of tumour invasiveness.

In this study, performed in two lung cancer cell lines, H23 and H460, we used the whole-cell configuration of the patch clamp technique and described a voltage-gated sodium current. This current is highly sensitive to tetrodotoxin (TTX) as well in H23 cells ( $IC_{50} = 11.4 \pm 0.2$  nM) as in H460 cells ( $IC_{50} = 13.0 \pm 0.1$  nM). In both cases, its activation threshold is around  $-50$  mV, it reaches a maximal amplitude around  $0$  mV and it reverses around  $+60$  mV. The time constant of recovery from inactivation is  $8.0 \pm 0.4$  ms ( $n = 6$ ) for H23 cells and  $10.0 \pm 0.2$  ms ( $n = 10$ ) for H460 cells. The superposition of availability-voltage curve and conductance-voltage curve on the same graph shows a window of voltage between  $-50$  and  $0$  mV where the channels are slightly activated and not fully inactivated. The mean membrane potentials of these cells are  $-29.2 \pm 1.7$  (n=14) for H23 cells, and  $-33.5 \pm 1.8$  (n=25) for H460 cells. This indicates that there must be a continuous entry of sodium ions in the cells.

In the two cell lines tested, RT-PCR demonstrate that numerous isoforms were expressed:  $Na_v$  1.2, 1.4, 1.5, 1.6 and 1.7 in H23 cells and  $Na_v$  1.3, 1.5, 1.6 and 1.7 in H460 cells. Thus the current observed in patch clamp is probably the resultant of numerous sodium currents.

When  $1 \mu\text{M}$  TTX was added to the culture medium, to fully block the current, neither cell proliferation nor migration through an  $8 \mu\text{m}$  diameter pore filter were affected. On the contrary, TTX reduced the ability of the cells to invade, through the same filter coated with a film of Matrigel, by about 40%. We conclude that these sodium currents are involved in the invasiveness properties of lung cancer cell lines through pathways which have to be determined.

## P38

**Use of karyophilic sugars to enhance the nuclear import of plasmids**

Christine Rondanino, Eric Duverger\*, 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: duverger@cns-orleans.fr

Non-viral vectors used in gene transfer are easier to produce and safer but are unfortunately less efficient. One of the limiting step in non-viral gene transfer is the nuclear import of plasmids. To circumvent this limitation, several authors reported the modification of plasmids with nuclear localization signals such as the basic PKKKRKV peptide (NLS of the simian virus 40 T antigen). The transfection efficiency of quiescent cells with such plasmids was slightly enhanced. According to the polyanionic character of DNA, this poor enhancement could be related to the adsorption of basic peptides on DNA grooves leading to a low accessibility to the cellular machinery.

In our work, plasmids were substituted with a neutral sugar previously shown to mediate the import of non-karyophilic proteins into the nucleus and therefore acting as a nuclear localization signal [1,2]. A sugar diazo derivative was synthesized and coupled onto the carbon-8 of guanine in a one-step reaction. The accessibility of the sugar (mannose or glucose) moieties present on glycosylated plasmids was tested by electrophoretic mobility shift assay in the presence of a lectin: ConA. Modified plasmids possessed a stronger nuclease resistance than unsubstituted ones. In digitonin-permeabilized cells, glycosylated plasmids were imported into the nucleus while non-glycosylated plasmids remained in the cytosol. Finally, in cells transfected by lipofection, the expression of glycosylated plasmids was 5- to 250-fold greater than that of sugar-free modified plasmids.

These results demonstrate that karyophilic sugar could thus be used to enhance the nuclear import of plasmids delivered with non-viral gene transfer vectors.

1. 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.

2. 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.

## P39

**SAFE HOMOGENISATION OF INFECTED TISSUES WITH A DISPOSABLE HOMOGENISER**

B Schnyder, V Yermeev, M Jacobs, D Torres, VJF Quesniaux, F. Bucher, R Moser, B Ryffel

CNRS, Orleans, France, Biomedical Foundation, Switzerland, University of Cape Town, South Africa and Medic Tools AG Zug

A rapid and save method to homogenise infected tissues is described. Infected mouse tissues are transferred in sterile, 50ml centrifuge tubes capped with a special lid containing a disposable, rotating plastic blade (Dispomix). The closed tubes are inverted and placed on a special mixer and rotated for 20 sec at 2-5000 rpm. The fine-dispersed tissues are thereafter analysed for viable pathogens using the microbial plating assays.

The short protocol using the Dispomix results in excellent, fine homogenisation of lung and liver tissues. We then tested *M. tuberculosis* and *L. monocytogenes* infection and analysed the recovery of viable bacteria from infected lung and liver tissues and compared the yield with classical homogenization techniques. The cfu values obtained from infected lung and liver were comparable with the closed system, but the recovery of viable bacteria was slightly higher than the glass homogenisation.

In conclusion, the method allows rapid and safe processing and analysis of highly infectious tissue samples, especially required for *M. tuberculosis*, prions and other pathogens. Furthermore, the system is fully disposable and inexpensive.

## Rôle de la PEBP/RKIP dans le cancer et dans son traitement

Françoise Schoentgen et Claudine Kieda

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2

Les PEBP/RKIP (phosphatidylethanolamine-binding-protein/Raf-kinase-inhibitor-protein) sont présentes dans de très nombreux organismes (mammifères, insectes, plantes, levures, bactéries). Dans tous ces organismes le rôle physiologique de cette famille de protéines semble être en relation avec le développement et la morphogénèse tissulaire et cellulaire.

Chez les mammifères plusieurs rôles biologiques majeurs ont été décrits pour la PEBP/RKIP qui est présente dans le cytoplasme des cellules: a) elle est un inhibiteur de protéases à sérine, b) un inhibiteur de la voie MAP-kinases, c) un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B et d) un activateur des protéines G hétérotrimériques. Dans tous les cas, la PEBP/RKIP interagit directement avec les protéines partenaires sans toutefois que l'on connaisse les conditions qui modulent ces interactions ni les sites qui sont impliqués (sites d'interaction qui semblent multiples). D'autre part, la PEBP/RKIP est une cible de l'oncogène PKC. La protéine kinase C est capable de phosphoryler la PEBP/RKIP sur la Ser153, inhibant son interaction avec Raf-1 et bloquant l'internalisation des récepteur couplés aux protéines G par inhibition de la kinase GRK-2 qui les phosphoryle. Cependant, il a été montré récemment que la PEBP/RKIP n'est pas seulement une protéine cytoplasmique, elle est aussi un facteur endocrine qui est sécrété dans le serum.

Un rôle très important de la protéine PEBP/RKIP a été signalé dans le cancer de la prostate : la surexpression de PEBP/RKIP est associée à la diminution du développement des métastases et à la diminution de l'invasion vasculaire dans la tumeur primaire. Ceci indique que PEBP/RKIP est un suppresseur des métastases qui semble fonctionner en diminuant l'invasion par le système vasculaire. La PEBP/RKIP est également un effecteur qui conduit à l'apoptose des tumeurs et des cellules cancéreuses humaines après traitement par chimiothérapie. PEBP/RKIP sensibilise les cellules cancéreuses de la prostate et du sein à l'apoptose induite par le 9NC (9-nitrocampothéine).

Très récemment, dans les cellules endothéliales, il a été montré que Raf-1 est impliquée dans la protection vasculaire contre l'apoptose *via* deux voies distinctes [33]. D'une part, le facteur bFGF (basic fibroblast growth factor) active Raf-1 en provoquant la phosphorylation de ses sérines 338 et 339 par PAK-1, ce qui entraîne la translocation mitochondriale de Raf-1 et la protection des cellules endothéliales de la voie intrinsèque de l'apoptose. D'autre part, le facteur VEGF (vascular endothelial growth factor) active Raf-1 en provoquant la phosphorylation de ses tyrosines 340 et 341 *via* la kinase Src et entraînant alors la protection des cellules endothéliales de la voie extrinsèque de l'apoptose. Raf-1 est donc un régulateur pivot de la survie des cellules endothéliales durant l'angiogénèse.

Pour comprendre les mécanismes par lesquels la PEBP/RKIP ralentit la vascularisation des tumeurs et empêche la formation des métastases nous avons entrepris une étude de son mode d'action au niveau des cellules endothéliales. Nous avons défini une démarche originale qui s'oriente suivant deux effets majeurs possibles de la PEBP/RKIP: 1) une action endogène (intracellulaire) qui est directement liée à l'expression de la protéine à l'intérieur des cellules ; 2) un rôle endocrine (extracellulaire) par lequel la PEBP/RKIP agit *via* la circulation sanguine à l'extérieur des cellules.

## P41

**RELATION ENTRE L'ANALYSE PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE SOUCHES FAIBLEMENT VIRULENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES***S. Témoin<sup>1</sup>, S. Roche<sup>1</sup>, P. Gracieux<sup>1</sup>, I. Albert<sup>2</sup>, O. Grépinet<sup>1</sup>, P. Cossart<sup>3</sup>, P. Velge<sup>1</sup><sup>1</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly, France<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, Département de Mathématique et d'Informatique Appliquées, 75005 Paris, France<sup>3</sup> Institut Pasteur, Unité des Interactions Bactéries-Cellules, 75015 Paris, France

Actuellement, toute souche de *Listeria monocytogenes* est considérée comme potentiellement virulente. Pourtant, une variabilité de la virulence observée *in vivo* et *in vitro* a été décrite dans la littérature. Un test de détection *in vitro* de plages de lyse suivi d'un test d'inoculation sous-cutanée plantaire sur souris nous ont permis de caractériser 26 souches faiblement virulentes [1]. Ces souches sont réparties, selon une classification hiérarchique ascendante, en 4 groupes distincts selon 4 variables phénotypiques : taux de pénétration intracellulaire, nombre de plages de lyse formées et dosages des activités phospholipases (PI-PLC et PC-PLC). A partir des données phénotypiques, les gènes de virulence intervenant dans les différentes étapes du cycle d'infection et pouvant être liés à cette faible virulence ont été séquencés. Sur les 11 souches du groupe I, qui ne pénètrent pas dans les cellules, ne forment pas de plage de lyse et n'expriment aucune activité phospholipasique, 8 présentent une substitution dans le régulateur transcriptionnel PrfA et 3, un PrfA tronqué. Une des 3 souches du groupe II, qui pénètrent dans les cellules, ne forment pas de plage de lyse et n'expriment que l'activité PI-PLC, présente 4 substitutions dans PC-PLC, et 4 dans ActA. De même, 5 des 6 souches du groupe III, qui pénètrent dans les cellules, ne forment pas de plage de lyse et n'expriment que l'activité PC-PLC, présentent 3 substitutions dans PI-PLC et 22 dans ActA. Les 6 souches du groupe IV qui ne colonisent que faiblement les souris [2], ne se différencient quasiment pas des souches virulentes par leurs caractères phénotypiques. Ces résultats suggèrent un lien entre le phénotype des ces souches et les substitutions génotypiques observées. Ces substitutions retrouvées chez plusieurs souches suggèrent une évolution commune. Nous devons déterminer si les substitutions observées dans les différents gènes de virulence sont la cause de la faible virulence.

- [1] Roche, S. M., P. Velge, E. Bottreau, C. Durier, N. Marquet-van der Mee, and P. Pardon. 2001. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int J Food Microbiol* **68**:33-44.
- [2] Roche, S. M., P. Gracieux, I. Albert, M. Gouali, C. Jacquet, P. M. Martin, and P. Velge. 2003. Experimental validation of low virulence in field strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **71**:3429-36.

## P42

**Characterisation of Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) in chicken muscle**

Tesseraud Sophie<sup>1</sup>, Vaudin Pascal, Duchene Sophie, Dupont Joëlle

*INRA Tours, 37380 Nouzilly, France*

PTEN is a lipid and protein phosphatase that is able to inhibit significant actors of cell signalling (i.e. Phosphatidylinositol 3' kinase or MAP Kinase pathways). Overexpression of PTEN in vitro is able to induce the arrest of cell cycle and/or apoptosis. In contrast, deletion or loss-of-function mutations of PTEN are implicated in a variety of human cancers, including prostate, breast, brain, endometrial, and ovarian cancers. The aim of the present study was to characterize PTEN in chicken muscle and to analyze its regulation during ontogenesis.

Pectoralis major muscle was sampled for the embryonic period (18d embryo, E18), at hatching (D0) and after hatching in fed chickens aged of 2, 7 and 43d (D2, D7 and D43). The cloning of chicken PTEN cDNA was carried out by RT-PCR. Expression of PTEN mRNA was measured by Northern-blot; PTEN protein content was determined by Western-blot. The activity of PTEN was measured by using a colorimetric assay, which is known to quantify the free-phosphate released. The results were analyzed using a classical ANOVA (n = 4).

We cloned the totality of chicken PTEN cDNA; its translation in a putative protein showed more than 95% of sequence identity with that characterized in mammals (human, mouse). PTEN was expressed under 2 major transcripts in the majority of tissues including muscle. In this tissue, we observed that the expression of PTEN mRNA increased with age ( $P < 0.05$ ). Interestingly, the content of PTEN (protein characterized with an apparent molecular weight of 55 kDa) and its activity considerably decreased between the stages E18 and D43 (reduction by approximately 8 times,  $P < 0.001$ ). This divergence between the evolutions with age of mRNA on the one hand and of the values of protein content or activity on the other hand was confirmed on chickens of a different genotype.

In conclusion, we showed that the phosphatase PTEN was expressed and regulated during ontogenesis in chicken muscle. Additional studies are needed to determine its role, in particular in muscle differentiation.

Tél : 02.47.42.78.32, Fax : 02.47.42.77.78, e-mail : [tessereau@tours.inra.fr](mailto:tessereau@tours.inra.fr)

## P43

**DRUG-INDUCED PHOSPHOLIPIDOSIS DETECTED IN RAT AND HUMAN CULTURED WHITE BLOOD CELLS.**

A.Tilloy, F.Rodde, M-T.Masson, C.Sobry, P-R.Mompon, M-C.Bonnet, C.Hougham; M. Slaughter, S.Chevalier.

Pfizer, PGRD, Z.I. Pocé sur Cisse, BP 159, F-37401 Amboise Cedex, France. [Anne.Tilloy-Ellul@pfizer.com](mailto:Anne.Tilloy-Ellul@pfizer.com) <<mailto:Anne.Tilloy-Ellul@pfizer.com>> (02 47 23 77 72)

Drugs such as anti-arrhythmics (amiodarone, propranolol), antidepressants (fluoxetine, imipramine) or antimalarials (quinacrine, chloroquine) alter the metabolism of phospholipids. This, in turn, induces the accumulation of lysosomal multi-lamellar structures, characteristic of phospholipidosis<sup>1</sup> in various cell types. The pharmaceutical industry is keen to avoid the development of new drugs that can induce phospholipidosis. Therefore, the implementation of an in vitro assay allowing rapid detection of drug-induced phospholipidosis is of great interest. We describe here a new phospholipidosis assay based on white blood cells, isolated either from rat or from human blood, treated in vitro with chemicals. The cells were examined by transmission electron microscopy after 48 hours incubation with the chemicals and multi-lamellar structures were counted on representative samples. Ten chemicals known to induce phospholipidosis in rats or in humans were tested and found positive in both cell systems. Chemicals that do not lead to phospholipidosis in vivo (amikacin, isoniazid), did not produce lamellar bodies in rat or human blood cells. In addition, we showed that the severity of drug-induced phospholipidosis is comparable in rat and human white blood cells. Therefore, we have established a predictive and reliable in vitro assay to detect drugs susceptible to induce phospholipidosis in pre-clinical and clinical trials.

(<sup>1</sup> Kovadanti et al., 1990; Reasor et al., 1988)

**Protective role of membrane TNF in the host resistance to *Listeria* infection**

David Torres<sup>1</sup>, Laure Janot, Isabelle Maillet<sup>1</sup>, Valerie JF Quesniaux<sup>1</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1\*</sup>, and François Erard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS, Laboratoire d'immunologie et embryologie moléculaire (IEM2815), 3B rue de la Férollerie, F-45071 Orléans Cedex 2, France.

*Listeria* is a facultative intracellular bacterium and its virulence is due to its capacity to penetrate into mammalian cells, and to use their cellular machinery to proliferate and to evade the host immune response. TNF plays a critical role in the recruitment and activation of inflammatory cells in response to *Listeria* infection and most activities of this cytokine were attributed of the soluble form compared to membrane TNF (M-TNF). The role of M-TNF in the absence of secreted TNF for host resistance was tested in knock-in mice in which the endogenous TNF was replaced by a non-cleavable and regulated allele. While mice with complete TNF deficiency (TNF *-/-*) succumbed to infection within 4 days, mice expressing M-TNF were able to partially control *Listeria* infection ( $10^4$  cfu i.v.), but succumbed at a higher dose of infection ( $10^5$  cfu i.v.). In contrast to a complete TNF deficiency, mice with membrane TNF contained less bacteria in the liver and spleen and developed more confined microabscesses expressing inducible nitric oxide synthase. Furthermore, vaccination with an attenuated strain allowed protection of M-TNF and TNF deficient mice to a challenge with *Listeria* infection. Finally the transfer of T cells from immunised M-TNF mice protected TNF deficient mice. Therefore, the data suggest that membrane expressed TNF and likely on T cells play a critical role in host defence to *Listeria* infection and may partially substitute for soluble TNF.



## P45

**DEROULEMENT DE DOUBLES HELICES ARN-ADN PAR UNE HELICASE HEXAMERIQUE : LE FACTEUR DE TERMINAISON TRANSCRIPTIONNELLE RHO D'ESCHERICHIA COLI**

Céline Walmacq, Marc Boudvillain et Rachid Rahmouni.

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, UPR4301.

Les hélicases sont des moteurs moléculaires ubiquitaires qui utilisent l'énergie chimique, issue de l'hydrolyse de nucléotides triphosphates, pour se déplacer le long d'acides nucléiques et induire la dissociation d'obstacles (protéines) ou l'ouverture de régions en double hélice. Ces propriétés contribuent au remodelage des complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans de nombreux processus biologiques. Par exemple, le facteur Rho est une hélicase homohexamérique, impliquée dans la régulation de la transcription chez la bactérie. Le modèle actuel suggère que l'hexamère Rho forme un anneau qui encercle un segment particulier du transcrite naissant, nommé RUT, à partir duquel Rho se déplace le long de l'ARN pour rattraper la machinerie transcriptionnelle et provoquer sa dissociation.

L'activité hélicase est souvent avancée pour expliquer la dissociation Rho-dépendante du complexe ternaire de transcription, néanmoins les mécanismes précis de ce processus restent mal définis. Pour mieux les comprendre, nous avons étudié l'activité hélicase du facteur Rho *in vitro* en faisant varier un certain nombre de paramètres expérimentaux (tels que la concentration et la nature du sel monovalent ou la température) ainsi que la nature du substrat (par exemple en modifiant la position et la longueur de la double hélice ARN-ADN le long d'un transcrite synthétique).

Dans nos conditions, Rho est une enzyme très processive lorsqu'elle se déplace le long d'un segment simple-brin. En revanche cette processivité diminue fortement lors de la dissociation d'une double hélice ARN-ADN : en moyenne Rho se décroche de son substrat après avoir déroulé 60-80 pb d'un hybride ARN-ADN. Ce résultat démontre, pour la première fois, que la translocation de Rho peut impliquer le passage vers des formes ouvertes de l'anneau hexamérique, qui diminue la processivité de l'enzyme. De plus, les profils cinétiques couplés à une analyse par simulation numérique indiquent que la translocation n'est pas l'étape cinétiquement limitante de la réaction hélicase. Cette dernière pourrait notamment être contrôlée par des étapes telles que l'activation de Rho ou encore des changements conformationnels. L'ensemble de ces résultats constitue une base solide pour avancer dans la compréhension du mécanisme de translocation de Rho le long de l'ARN.

P46

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

Elodie Montbroussou<sup>1</sup>, Françoise Borde<sup>1</sup>, François Lagelle<sup>1</sup>, Virginie E. Bender<sup>1</sup>, Michale Bouskila<sup>1</sup>, Fabien Blazy<sup>1</sup>, Laetitia Nicaise<sup>1</sup>, Aurelien Mignot<sup>1</sup>, Marie-Claire Bonnet<sup>1</sup>, Pascal Brizard<sup>1</sup>, Marie-Therese Masson<sup>1</sup>, Stéphane Chevalier<sup>1</sup>, Doris Cassio<sup>2</sup>, Christine P. Biagini<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PFIZER, Molecular and Cellular Toxicology Laboratory, Amboise, France.

<sup>2</sup> INSERM 442, Orsay, France.

The cytotoxicity profile of multiple classes of pharmaceuticals was evaluated in Liverbeads of different species and in WIF-B9 cell line, monitoring LDH, MTT, ATP, GSH and cell morphology. Transport inhibition was also investigated in WIF-B9 cells. Toxicity ranking was found comparable, with marked differences observed for some compounds and related to the different metabolic and inducibility capacities of the two models. These results indicate that Liverbeads and WIF-B9 cells represent useful complementary models to investigate metabolism-hepatotoxicity relationships in vitro.

## P47

**Présence d'une forme libre de furine PC2 dans le fluide épидидymaire.**

Thimon véronique, Dacheux jean-louis, Gatti jean-luc.

Equipe "Gamètes Mâles et Fertilité" UMR 6175, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA de Nouzilly, Monnaie 37380, France

L'épididyme est un organe spécialisé formé d'un tubule convoluté qui relie le testicule au vas deferens. Cet organe, qui peut être divisé en trois grandes régions anatomiques (tête, corps, queue), a pour fonction la maturation finale des spermatozoïdes qui les rend mobiles et féconds. Au cours de cette maturation, la membrane des spermatozoïdes est fortement remaniée en relation avec les changements du milieu épидидymaire qui les entoure. Parmi ces remaniements, la coupure protéolytique de certaines protéines de la membrane est clairement démontrée, mais à ce jour aucune des protéases impliquées dans ce mécanisme n'est connue. La furine (ou PC2) est une endoprotéinase appartenant à la famille des pro-protéines convertase qui est impliquée dans la maturation des précurseurs de protéines inactives. Retrouvée dans tous les tissus de mammifères, la furine est ancrée dans la membrane de l'appareil de Golgi via son domaine transmembranaire. Cette protéine se retrouve aussi à la membrane plasmique, et *in vitro* il a été montré qu'elle peut être libérée après un clivage protéolytique au niveau de sa région d'ancrage. Cette enzyme pourrait être un candidat pour les changements qui ont lieu sur la membrane des spermatozoïdes.

Nous avons montré par western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal que cette endoprotéinase est présente dans le fluide épидидymaire du corps de l'épididyme de différentes espèces. Elle est ensuite dégradée ou réabsorbée pour disparaître du fluide de la région caudale de l'organe. Ces observations ont été confirmées par l'utilisation de substrats fluorescents spécifiques de la furine testés avec des fluides épидидymaires. La furine présente dans le fluide ne provient pas des spermatozoïdes et par RT PCR nous avons observé que la furine est exprimée tout le long de l'épididyme. La purification de cette protéine à partir du fluide du corps de l'épididyme est en cours afin de confirmer son identité par spectrométrie de masse.

Ce travail montre pour la première fois qu'*in vivo* que de la furine peut être trouvée dans un fluide biologique. Le rôle joué par cet enzyme dans la maturation membranaire du spermatozoïde ou de son environnement reste à déterminer.

## **EXTRACTION DIFFERENTIELLE DES PROTEINES MEMBRANAIRES POUR L'OBTENTION DE MARQUEURS DE MATURATION SPERMATIQUE.**

Belleannée Clémence, Belghazi Maya<sup>1</sup>, Boursier Céline<sup>1</sup>, Gatti Jean-Luc, Druart Xavier, Dacheux Jean-Louis, Dacheux Françoise.

PRC Equipe « Gamètes Mâles et Fertilité » UMR 6175 INRA-CNRS-Université-Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France.

(1) Service de Spectrométrie de Masse pour la Protéomique, 37380 Nouzilly, France.

Durant le transit dans l'épididyme, au cours duquel les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant, le revêtement membranaire des gamètes subit d'importantes modifications par disparition de protéines préexistantes (perte par détachement ou masquage) ou addition (adsorption ou intégration) de nouvelles protéines d'origine épидидymaire. L'objectif de l'étude est l'identification systématique des protéines qui présentent des variations quantitatives et/ou qualitatives à la surface des spermatozoïdes lors de leur maturation dans les différentes régions de l'épididyme.

Chez le ver rat, les spermatozoïdes correspondant aux différents stades de maturation sont obtenus par microperfusion tout le long du tube épидидymaire. Après séparation des spermatozoïdes du fluide, les protéines de surface ont été marquées à la sulfo-NHS-LC-biotine. Deux approches successives ont été réalisées pour accéder aux protéines de surface des spermatozoïdes :

- 1- extraction des protéines liées par faible affinité (libérées en présence KCl 0,75M).
- 2- extraction des protéines intrinsèques avec un détergent non ionique le NP40.

Les échantillons sont séparés par électrophorèse 1D et 2D. Après découpage des spots de protéines d'intérêt, l'identification est réalisée par spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS). Les protéines biotinylées sont transférées sur membranes de nitrocellulose et révélées à l'aide d'un substrat spécifique après incubation en présence de streptavidine-peroxydase. La digitalisation des informations est réalisée dans le but d'une étude globalisée comparative.

En incubant les spermatozoïdes avec du KCl, il est possible de mettre en évidence de nombreuses protéines relarguées par le spermatozoïde et cela en fonction de son état de maturation. Ainsi parmi les modifications majeures, une protéine de 115 KDa et une de 26 KDa présentes sur les spermatozoïdes de la tête et du corps de l'épididyme disparaissent dans la région caudale. Par spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier une trentaine de protéines dont celle de 115 KDa (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine) et la 26 KDa (Glutathione S-Transférase).

Suite à ce travail, nous envisageons de poursuivre l'analyse des protéines membranaires par l'utilisation de techniques couplant spectrométrie de masse et marquage des protéines. Cette technique (Isotope-Coded Affinity Tag) va nous permettre d'identifier et de quantifier les protéines qui présentent des variations ; protéines, qui pour la plupart sont très hydrophobes et impossibles à séparer par électrophorèses bidimensionnelles.

## Fast establishment of hairy root clones producing high ajmalicine and serpentine contents in *Catharanthus roseus*

Stéphanie Guillon<sup>1</sup>, Martine Thiersault<sup>1</sup>, Marc Rideau<sup>1</sup>, Pascal Gantet<sup>2</sup> and Jocelyne Trémouillaux –Guiller<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UPRES EA 2106 «Biomolécules et Biotechnologies Végétales», Université François Rabelais, UFR des Sciences pharmaceutiques et UFR des Sciences et Techniques- parc de Grandmont 37200 Tours, France

<sup>2</sup> Present address : Université Montpellier<sup>2</sup>, Laboratoire de Biochimie et de Physiologie Végétale, UMR PIA 1096 « Analyse fonctionnelle du génome du riz » – 34095 Montpellier cedex 5, France

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle) biosynthesises a wide spectrum of terpenoid indole alkaloids whose a few possess anti-hypertensia (ajmalicine, serpentine) or powerful anti-neoplastic (vinblastine, vincristine) activities. Currently such compounds, extracted at low levels from whole plants, are equally produced by semi-synthesis. As an alternative culture model, cell suspensions and tissue cultures have been extensively established in order to enhance the production of interest alkaloids [1]. Owing to their biochemical stability due to high levels of cellular differentiation, hairy root cultures have been widely used to increase the production of secondary metabolites [2]. Numerous monomers, as ajmalicine, serpentine and catharanthine may be accumulated in hairy root clones of *C. Roseus* [3]. The objective of our work was - to establish an efficient method of genetic transformation -to confirm, by molecular analyses, the transgenic state of hairy root clones cultured in liquid hormone-free medium and to evaluate the monomer alkaloid contents from hairy roots, elicited or not.

*Agrobacterium rhizogenes*, a phytopathogen bacterium, is responsible for the hairy root syndrome [4]. The 15834 *A. rhizogenes* strain harbouring a voluminous Ri plasmid was used. T-DNA, a portion of this plasmid possesses two separate regions: T<sub>L</sub>-DNA and T<sub>R</sub>-DNA carrying respectively the A, B, C *rol* genes and the *aux1-2* genes that may be independently transferred in the plant genome. After two weeks, primary roots appeared at the wound site of inoculated *C. roseus* leaves. To initiate hairy root clones on solid medium, each root was excised and separately cultured. Of 150 inoculated leaves, 219 clones of hairy root developed on solid medium, and 33 of them were transferred in agitated liquid medium. Three well-established clones (C18, C50a, C50b) were submitted to molecular and chemical analyses.

Despite an obvious hairy root phenotype (hormone independence, lack of geotropism and extensive lateral branching), the stable genetic transformation of the three clones was investigated. As expected, the positive integration of the A,B, C *rol* and *aux1-2* genes was verified by PCR amplification process, whereas their expression was revealed by 3' RACE-PCR, excluding the amplification from bacterial *rol* transcripts. Our molecular analyses prove convincingly the transgenic state of the three clones studied.

The monomers, ajmalicine and serpentine, were extracted from frozen hairy roots following an acid-base extraction. From the total extracts, both alkaloids were separated by thin layer chromatography and quantified by spectrofluorometry. Respective contents were evaluated to 270, 700, 1200 µg/g (ajmalicine) and 500, 980, 2500 µg/g DW (serpentine) in the untreated clones (C18, C50a, C50b), whereas the highest levels of ajmalicine (290, 980, 1280 µg/g) and of serpentine (840, 2180, 2700 µg/g DW) were found in the clones treated with an abiotic elicitor. Such ajmalicine contents are obviously superior to those evaluated in wild-type roots (198 ± 3), leaves (22 ± 3), flowers (5 ± 0.6), fruits (7.3 ± 2.5) and in the cell suspension (435 ± 45) µg/g/DW of *Catharanthus roseus*.

In summary, we have developed an original and efficient transformation method for the hairy root obtention from leaves of *C. roseus*. The transgenic state of three clones has been confirmed. High contents of ajmalicine and serpentine were quantified in hairy roots treated with an abiotic elicitor or not. Other alkaloid monomers could be evaluated by HPLC analysis. Such a feasible system to produce transgenic roots could also be used to integrate and over-express the genes encoding enzymes involved in the indole alkaloid biosynthesis pathways.

[1] Van der heidjen R., Jacobs D. I., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R., (2004) The catharanthus alkaloids : pharmacognosy and biotechnology. Current Medicinal Chemistry, 11, 607-628, 3

[2] Canto-Canché B. and Loyola-Vargas V. M., (1999). Chemicals from roots, hairy roots and their application. In : Shahidi (eds), Chemicals via Higher plant bioengineering. Kluwer academic, Plenum Publishers, NY.

[3] Bhadra R., Vani S., Shanks J.V., (1993). Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. Biotechnol. Bioeng., 4, 581-592.

[4] Meyer AD, Tempé J, Costantino P, 2000 Hairy root: A molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. Molecular Plant-Microbe Interactions 5: 93-139.

## P50

## SECRETORY ACTIVITY OF BOAR CAPUT EPIDIDYMAL EPITHELIAL CELLS IN CULTURE.

Bassols Judit<sup>(1)</sup>, Bonet Sergi<sup>(1)</sup>, Dacheux Françoise, Dacheux Jean-Louis.

Equipe « Gamètes Mâles et Fertilité », UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France.

<sup>(1)</sup> Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Girona, Campus de Montilivi, s/n. 17071-Girona, Spain

Mammalian spermatozoa acquire their motility and the ability to fertilize oocytes during their transit through the epididymal duct. This maturation process depends on the secretory activity of epithelial cells lining the luminal surface of the tubule. Previous studies in boar showed that the epididymal epithelium synthesizes and secretes numerous proteins which are specific to each region (Syntin et al 1996).

We have developed a simplified system to culture boar epididymal fragments, in order to mimic the epididymal microenvironment and to study the process of boar sperm maturation *in vitro*. To verify whether epididymal epithelial cells in culture were functional we studied the synthesis and secretion of proteins.

Tubules from the proximal caput (zone 0) and middle caput (zone 2) of the boar epididymis were isolated from conjunctive tissue under a stereomicroscope in sterile conditions and minced into small pieces (2-5 mm). About 10 epididymal fragments were cultured in 24-well culture plates with supplemented RPMI-1640 medium (in presence of different concentrations of androgens) at 32°C and 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air and 100% humidity. The synthesis and secretion of proteins were studied in all these conditions after 0, 1, 2, 4, 8 and 16 days of culture by incubating epididymal fragments with DMEM containing 100 µCi <sup>35</sup>[S]methionine and cysteine during 4 h at 32°C, 5% CO<sub>2</sub> in air and 100% humidity. Characterization of the major neosynthesized proteins was performed electrophoretically by one- and two-dimensional PAGE analysis. Several epididymis-expressed genes were also analyzed using RT-PCR assays.

Our results showed that the major proteins secreted *in vitro* by the caput epididymal fragments (zones 0 and 2) during the first 4 days of culture were the same as those previously described *in vivo*. In the proximal caput:(zone 0), three major proteins were expressed: RNase-A-like protein (25-41 kDa), glutathione peroxidase (GPX: 24 kDa) and hexosaminidase (Hex: 65 kDa). The middle caput (zone 2) was characterized by the presence of an intense band of clusterin (CLU: 41-52 kDa) and two other proteins: procathepsin L (40 kDa) and cholesterol transfer protein (HE1/CTP: 19-24 kDa). After 4 days, the regionalized epididymal secreted proteins disappeared. From this time, the pattern of secretion in both cultures was the same. The results of RT-PCR were in agreement with those obtained with SDS-PAGE. In the different conditions studied, the same results were obtained, so the temperature and the concentration of androgens did not affect the secretory activity of these cells.

These results show that boar epididymal epithelial cells retain *in vitro* the same pattern of protein secretion as *in vivo* during 4 days in culture. This system might be a valuable tool for studying the mechanism of sperm maturation in boars. Whether these cells are functional in culture, they should be able to promote *in vitro* several features of sperm maturation.

## P51

**Identification des épitopes neutralisants de la protéine majeure de capsid du papillomavirus humain de type 31 à l'aide d'anticorps monoclonaux**

Maxime J.J. Fleury, Antoine Touzé, Eva Alvarez, Guillaume Carpentier, Marie-Christine Maurel, Jean-François Vautherot et Pierre Coursaget.

Les papillomavirus humains (HPV) sont des virus à ADN non enveloppés possédant une capsid icosaédrique de 50 à 55 nm de diamètre composée des protéines L1 et L2. Lorsque les protéines de capsides sont produites en système d'expression baculovirus-cellules d'insecte elles s'auto-assemblent en pseudo-particules virales (VLP). Il est possible de réaliser des vecteurs de gène à partir de ces pseudo-capsides. Dans le but d'identifier les épitopes inducteurs d'anticorps neutralisants responsables de l'efficacité limitée de ces vecteurs lors de ré-injections, nous avons produits et caractérisés 18 anticorps monoclonaux anti-capsid d'HPV-31. Tous sont dirigés contre la protéine L1. Quinze anticorps reconnaissent des épitopes conformationnels dont 13 sont spécifiques de type et neutralisants, et deux non spécifiques de type dont l'un est également neutralisant. Trois anticorps non neutralisants et cross-réactifs reconnaissent des épitopes linéaires. Les 5 épitopes reconnus par les anticorps cross-réactifs ont été identifiés sur la boucle FG de la protéine L1 à l'aide de VLP chimériques de type 16. La carte épitopique réalisée par analyse au BIAcore des compétitions entre anticorps, indique que tous les anticorps produits sont différents mais reconnaîtraient des épitopes proches.

Mots clés : Papillomavirus, HPV-31, protéine L1, épitope, anticorps monoclonaux, cross-réactivité, anticorps neutralisant.

## P52

**ÉTUDE DU RÔLE MÉTABOLIQUE DE TROIS GÈNES LOCALISÉS DANS UN NOUVEL ÎLOT DE PATHOGÉNICITE POTENTIEL (EPI-I<sub>BEN2908</sub>) DE LA SOUCHE D'*ESCHERICHIA COLI* PATHOGENE AVIAIRE BEN2908**

Iman Chouikha, Pierre Germon, Maryvonne Moulin-Schouleur et Catherine Schouler, Equipe de Pathologie Bactérienne, INRA, 37 380 Nouzilly, France.

Les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables d'infections extra-intestinales à point de départ respiratoire chez les volailles. La pathogenèse de la colibacillose aviaire est encore mal connue. L'identification de facteurs de virulence des APEC permettra d'améliorer leur diagnostic, de comprendre le schéma infectieux et d'étudier leurs parentés avec les souches *d'E. coli* pathogènes pour l'homme. Les facteurs de virulence décrits sont communément portés par de larges plasmides présents dans ces souches ou par le chromosome au sein d'éléments mobiles tels que les transposons ou les îlots de pathogénicité (PAIs). Nous avons identifié en 3' du locus de l'ARNt *selC* de la souche APEC BEN2908 une région chromosomique d'environ 50 kb qui présente les caractéristiques d'un PAI (G+C% différent du reste du chromosome, présence de gènes dont le produit est potentiellement impliqué dans la virulence, présence de gènes de mobilité tels que des transposases, intégrases phagique). Cette région, nommée EPI-I<sub>BEN2908</sub>, pourrait être le second îlot de pathogénicité identifié chez les APEC.

Trois des cadres ouverts de lectures (orf 3, orf 4 et orf 5) de cette région semblent impliqués dans le métabolisme des glucides, les produits putatifs de ces orfs ayant des homologies avec : un régulateur transcriptionnel de la famille LacI, un transporteur des hexuronates et une enzyme de la famille des alpha glucosidases. La délétion de ces trois orfs par la technique de mutagenèse dirigée selon Datsenko et Wanner (PNAS, 2000) nous a permis de comparer les sources de carbones utilisées par la souche sauvage (BEN2908) et par le mutant de délétion (BEN2929). L'importance de l'orf 3, l'orf 4 et l'orf 5 dans le métabolisme aérobiose (37°C) de la souche BEN2908 a été analysée à l'aide d'une technique de criblage en plaque, les PMs (Phenotype Microarrays, Biolog Inc.) à partir de 190 sources de carbone différentes. Cette nouvelle technologie développée par Barry R. Bochner utilise la réduction d'un sel de tetrazolium pour détecter colorimétriquement le métabolisme pour une source d'énergie de la bactérie.

Les premiers résultats nous indiquent des différences phénotypiques pour quelques sources carbonées entre la souche sauvage et le mutant. Ces résultats restent à être approfondis par des études de croissance des souches BEN2908 et BEN2929 dans des milieux minimum contenant chacune des sources de carbone identifiées.



## P53

**REPLICATION ET MORPHOGENESE DU VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK:  
ETIQUETAGE DE GENES VIRAUX DANS UN CONTEXTE BACRB1B**

Najat Chbab, Annick Francineau, J.F Vautherot.

Laboratoire LVMI, UR86 BASE, INRA-Centre de Tours, 37380 Nouzilly

La maladie de Marek est une infection lymphoproliférative du poulet dont l'agent pathogène est le virus MDV (Marek's Disease Virus). Le MDV est classé dans le groupe des  $\alpha$ -herpèsvirus en raison de sa structure génomique et des homologies de séquences avec les virus du même groupe. Les herpèsvirus forment un ensemble assez homogène en terme de structure. Ils possèdent une capsidie icosahédrique contenant l'ADN double brin linéaire, une enveloppe dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales et un tégument qui assure une continuité physique entre la capsidie et les glycoprotéines. Les protéines tégumentaires jouent un rôle majeur dans l'assemblage et la maturation des  $\alpha$ -herpèsvirus.

Le travail de thèse porte sur l'étude des protéines de tégument du MDV. Il a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de réplication et de morphogénèse virale dans les cellules des follicules plumeux, seul organe où la réplication du MDV aboutit à la formation de particules infectieuses libres. La stratégie adoptée repose sur l'étiquetage de gènes viraux par un nonapeptide HA en utilisant les possibilités de recombinaison homologue en chromosome bactérien artificiel contenant le génome de la souche pathogène RBIB du virus MDV1 (BACRB1B). Cette technique permet de localiser rapidement et spécifiquement les produits des gènes étiquetés tant au niveau cellulaire qu'*in vivo*. Les gènes ciblés sont d'une part, les gènes UL49 et UL48 codant deux protéines majeures de tégument spécifiques des  $\alpha$ -herpèsvirus, VP22 et VP16, et d'autre part, les gènes UL37 et UL17 codant des protéines tégumentaires dont le rôle n'est pas connu lors de la réplication du MDV. Les résultats antérieurs ont montré que la protéine VP22, contrairement à la protéine VP16, est fortement exprimée dans les cellules infectées par le MDV et est indispensable à la multiplication virale. Ainsi, l'obtention d'un virus pathogène BACRB1B étiqueté pour les gènes connus tel que UL49 et UL48 permet de valider le système d'étiquetage utilisé et d'évaluer l'intérêt de cette technique pour le suivi de l'expression des gènes moins connus chez le MDV tels que UL37 et UL17.

Les premiers résultats obtenus après transfection des différents BACRB1B dans des cellules primaires de peau de poulet ont confirmé les résultats antérieurs. La protéine VP22 est fortement exprimée et présente une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique alors que la protéine VP16 est plus difficile à localiser du fait de son faible niveau d'expression. Les protéines pUL17 et pUL37 sont plus faiblement exprimées et pUL17 se localise principalement au noyau. Des expériences complémentaires sont en cours afin de caractériser ces protéines en Western blot. Des études en microscopie électronique et confocale permettront de préciser les voies de trafic de ces protéines ainsi que leur implication dans l'assemblage de la particule virale.

En conclusion, nous avons construit les outils permettant d'obtenir des virus étiquetés en C-terminal par un peptide reconnu par un anticorps monoclonal, validé la technique d'étiquetage en contexte BACRB1B et montré qu'il était possible de suivre la néosynthèse de protéines virales dans le contexte d'une infection en culture de cellules.

## CONFERENCES

<b>C1 - Physiologie et thérapeutique expérimentale de l'hypertension artérielle pulmonaire</b> Serge Adnot.....	59
<b>C2 – Amélioration de l'enracinement du noyer (<i>Juglans sp.</i>) par transformation génétique</b> Breton Christian.....	60
<b>C3 – Les cellules souches de tissus hématopoiétiques</b> Charbord Pierre.....	61
<b>C4 - La fibrillation auriculaire : Nouveaux regards sur une arythmie centenaire</b> Cosnay Pierre.....	62
<b>C5 - L'invasion des cellules de mammifères par les bactéries pathogènes</b> Cossart Pascale.....	63
<b>C6 - Interférence d'ARN chez les végétaux : applications et perspectives</b> Crèche Joël.....	64
<b>C7 - La drosophile, un modèle pour disséquer les interactions hôte-apthogènes et la réponse immunitaire innée</b> Lemaitre Bruno.....	65
<b>C8 - Politique de l'Agence Universitaire de la Francophonie en matière d'appui à la recherche universitaire</b> Lepoivre Philippe.....	66
<b>C9 – Glycomimétiques : potentiel comme agents thérapeutiques</b> Martin Olivier.....	67
<b>C10 - Les défensines de mammifères</b> Pinault Charles.....	68
<b>C11 - Les systèmes de défense des végétaux</b> Simmoneau Philippe.....	69
<b>C12 – Les nouveaux coronavirus humains</b> Vabret Astrid.....	70

## C1

**PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE EXPERIMENTALE DE L'HYPERTENSION  
ARTERIELLE PULMONAIRE**

Serge ADNOT,

Hôpital Henri Mondor, Créteil,

Tél : 01.49.81.26.89

*E : mail : adnot@im3.inserm.fr*

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) primitive ou secondaire est une pathologie inexplicée, fatale dans ses formes graves de l'adulte ou du nouveau-né, sans traitement réellement satisfaisant. La compréhension de la maladie a considérablement évolué ces dernières années, à la fois au plan génétique, par l'identification de mutations du gène BMP-RII (récepteur II de la protéine morphogénique osseuse) dans l'HTAP primitive familiale, et physiopathologique, par l'identification de mécanismes moléculaires impliqués dans le remaniement hypertrophique de la paroi artérielle tel le rôle du transporteur de la sérotonine (5-HTT) dans l'hyperplasie des cellules musculaires lisses (CML-AP). La mise en évidence du rôle étiologique de la voie BMP (protéine morphogénique osseuse) dans l'HTAP primitive familiale soulève maintenant de nombreuses questions concernant le lien entre le génotype mutant pour le récepteur II des BMP et le phénotype HTAP. D'autres facteurs génétiques ou des facteurs présents dans l'environnement jouent probablement un rôle crucial, puisque l'HTAP n'apparaît pas chez tous les porteurs de mutations BMP-RII. Simultanément, des études fonctionnelles explorant les altérations vasculaires complexes de l'HTAP ont mis en évidence d'importantes voies moléculaires impliquées dans la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) pulmonaires, le dysfonctionnement des cellules endothéliales et le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Ces voies pourraient jouer un rôle soit dans l'initiation, soit dans la pérennisation de la maladie. La mise en évidence d'un lien étroit entre le polymorphisme génétique de certains des gènes candidats liés à ces processus et l'HTAPP est en faveur d'une relation causale entre l'expression ou la fonction de ces gènes et le phénotype HTAP. L'association entre l'HTAPP et l'allèle long (L) du gène du transporteur de la sérotonine (5-HTT) montre que le 5-HTT, qui contrôle l'hyperplasie des cellules musculaires lisses, joue un rôle important dans la physiopathologie de la maladie. L'identification de ces voies moléculaires devrait clarifier la pathogénie non seulement de la forme primitive mais aussi des formes secondaires d'hypertension pulmonaire. Ces nouvelles connaissances devraient aboutir dans les années qui viennent à la mise au point d'approches thérapeutiques nouvelles et plus sélectives pour l'hypertension pulmonaire.

## C2

## AMELIORATION DE L'ENRACINEMENT DU NOYER (*JUGLANS SP.*) PAR TRANSFORMATION GENETIQUE

Christian Breton, Grégory Montiel.

INRA-Orléans, Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestière, BP 20619 Ardon. 45166 Olivet, France.  
Tel.: (33) (0)2 38 41 78 71- Fax: (33) (0)2 38 41 78 79  
<http://www.orleans.inra.fr/LeCentre/Unites/URAGPF/durami.html>

L'expression des gènes eucaryotes est régulée par des facteurs de transcription. Ces facteurs sont des protéines interagissant avec l'ADN au niveau de séquences *cis*-régulatrices localisées dans les promoteurs de gènes cibles. Chez les plantes, des facteurs de transcription spécifiques interviennent dans le contrôle de la différenciation morphologique et de la différenciation métabolique. Ils sont en général structurellement et fonctionnellement conservés d'une espèce à l'autre et permettent souvent, de par leur action coordonnée sur la régulation de plusieurs gènes cibles, d'orienter la morphogenèse et/ou la différenciation métabolique des végétaux (Montiel et al. 2003, 2004).

Chez le noyer, l'induction et le développement des racines adventives restent encore très mal maîtrisés. Ceci contribue à limiter la multiplication en masse de noyers hybrides, *Juglans nigra* x *Juglans regia*, correspondant à des génotypes "élites" quant à la production de bois de haute qualité. L'identification de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la rhizogenèse permettrait d'améliorer l'enracinement de nouveaux génotypes récalcitrants mais aussi d'améliorer la croissance des arbres. Préalablement identifié chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le gène *Agl12*, qui code un facteur de transcription à boîte MADS, est exclusivement exprimé au niveau des racines. Les rôles importants joués par les facteurs de transcription à boîte MADS chez les végétaux dans la différenciation des organes reproducteurs ont amené à formuler l'hypothèse qu'*Agl12* pourrait être impliqué dans l'organogenèse racinaire. Pour caractériser fonctionnellement ce facteur de transcription, l'impact de sa surexpression a été évalué par transformation génétique d'embryons somatiques de noyer. Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation positive entre le niveau de la surexpression du gène *Agl12* et le développement des racines. De plus, certains embryons transgéniques présentent deux racines ou deux pôles racinaires et des observations histologiques ont mis en évidence des structures de type racine sur les cotylédons. Le gène de noyer *w-Agl12* orthologue du gène *Agl12* d'*A. thaliana* a été isolé et son expression est également racine-spécifique. Ces résultats tendent à assigner un rôle important au facteur de transcription AGL12 dans les mécanismes de différenciation racinaire.

Montiel G., Gantet P., Jay-Allemand C., and Breton C. (2004) Transcription factor networks: pathways to the knowledge of root development. **Plant Physiol.** (sous presse)

Montiel G., Breton C., Doireau P., Jay-Allemand C. and Gantet P. (2003) Transcription factors that regulate secondary metabolism biosynthesis pathways: key actors for plant eco-physiology and ontogeny. **Recent Res. Devel. Plant Cell Physiol.** 1: 83-98

## C3

**LES CELLULES SOUCHES DES TISSUS HEMATOPOIETIQUES**

Pierre Charbord

Equipe INSERM-ESPRI/EA3855  
Faculté de Médecine de Tours  
[charbord@med.univ-tours.fr](mailto:charbord@med.univ-tours.fr)

La formation des cellules du sang (hématopoïèse) est un processus extrêmement dynamique puisque plusieurs millions de cellules sont produites chaque jour chez un individu normal pour assurer le renouvellement des cellules circulantes. Les sites de formation varient au cours du développement. Au cours de la vie embryonnaire le sac vitellin et la région aorte-gonade-mésonephros sont les premiers sites de l'hématopoïèse. Le foie prend le relais au cours de la vie fœtale. Après la naissance c'est la moelle osseuse qui est le siège de l'hématopoïèse. Dans ces différents sites, on trouve deux types de cellules souches : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui se différencient selon les différents lignages sanguins (globules rouges, globules blancs et plaquettes) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui contrôlent le fonctionnement des CSH. Les CSM jouent également un rôle important dans la réparation du tissu squelettique puisqu'elles sont capables de se différencier en cellules de l'os et du cartilage. Nous évoquerons l'historique des découvertes qui ont permis la description de ce système cellulaire complexe et les perspectives de traitement de différentes maladies du sang ou du tissu conjonctif qui résultent de la compréhension de ce système.

## C4

**LA FIBRILLATION AURICULAIRE : NOUVEAUX REGARDS SUR UNE ARYTHMIE CENTENAIRE**

J. Lignon, Z. Bichler, F. Gannier, D. Migliore-Samour, **P. Cosnay** et C. O. Malécot.

Effets sédatifs et cardiaques de la médétomidine chez des souris transpolygéniques pour un fragment du chromosome 21 humain porteur du gène KCNJ6.

Laboratoire de Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires ; UMR 6542 CNRS ; Faculté des Sciences, Parc Grandmont, 37200 Tours. Tel : 0247367113. E-mail : [lignon@univ-tours.fr](mailto:lignon@univ-tours.fr).

La trisomie 21, ou syndrome de Down, est caractérisée par un retard mental, un faciès mongolien, des défauts immunologiques et des malformations et/ou dysfonctionnements cardiaques. Ces problèmes sont liés aux gènes surnuméraires d'une partie du chromosome 21 humain appelée DCR (Down Critical Region). Smith *et al.* (1995. *Genomics*. **27**, 425-) ont créé des lignées de souris hétérozygotes pour des YAC contenant des fragments de la DCR humaine, à partir desquelles nous avons créé des lignées homozygotes.

Les lignées Tg84 et Tg67 (YAC 285E6) possèdent le gène KCNJ6 codant pour une sous unité GIRK2 d'un canal potassique rectifiant entrant exprimé au niveau du cerveau et du cœur (famille GIRK nouvellement dénommée Kir3.x). Il a été vérifié par PCR que le YAC était incorporé et par RT-PCR que l'ARNm était transcrit dans le cœur et le cerveau des souris transgéniques. La médétomidine (MED), agoniste  $\alpha 2$ -adrénergique très spécifique (agonistes connus pour activer les sous-unités GIRK2), a été injectée en i.p. chez des souris FVB contrôles (CR) ou transgéniques (Tg67 & Tg84) de 6 et 12 mois. Les dérivations d1 et d2 de l'ECG ont été enregistrées sur des souris anesthésiées à l'halothane (1,5%) ou à l'uréthane (1,33 g/kg) avec une bande passante de 1 Hz à 10 kHz et digitalisées à 2 kHz.

A 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  la MED est sans effet sur les CR mais induit une sédation de  $120 \pm 40$  min chez les Tg84. A 170  $\mu\text{g}/\text{kg}$  la durée de sédation atteint  $3600 \pm 40$  min chez les Tg84 pour  $150 \pm 60$  min chez les CR (n=10).

Sous anesthésie à l'halothane, la fréquence cardiaque (Fc) est de  $385 \pm 21$  b.p.m chez les CR et de  $398 \pm 24$  b.p.m. chez les Tg67 (n=15). Le complexe QRS est immédiatement suivi d'une onde J positive caractéristique de la souris et d'une onde T négative de faible amplitude. La MED (170  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) induit une bradycardie (Fc diminue de moitié ; RR augmente de  $98 \pm 6\%$ ), un prolongement du QRS de  $34 \pm 6\%$  et une réduction de son amplitude de  $38 \pm 5\%$ . La MED induit de plus des blocs de conduction chez 70% des souris. Tous ces effets sont réduits chez les Tg67 ( $\Delta\text{RR} = 44 \pm 22\%$  ;  $\Delta\text{QRS} = 13 \pm 3\%$  en durée et  $21 \pm 10\%$  en amplitude). Les blocs de conduction sont absents.

Sous anesthésie à l'uréthane, Fc ( $637 \pm 38$  b.p.m. ; n=12) est proche de celle de la souris éveillée. Les amplitudes des ondes J et P sont plus importantes et l'onde T est alors positive en d2. Chez les Tg84, Fc est significativement plus élevée :  $693 \pm 8$  b.p.m. et la MED induit une bradycardie à 17  $\mu\text{g}/\text{kg}$  alors qu'elle n'est significative qu'à 51  $\mu\text{g}/\text{kg}$  chez les CR. La réduction de l'amplitude de l'onde S est également plus sensible chez les Tg84. Dans 6 cas sur 8, la MED a également induit des blocs de conduction marqués chez les CR alors que les Tg sont moins atteints. La MED induit également une réduction très significative de l'amplitude de l'onde P chez les CR et les Tg. Ces effets sont mimés par le carbachol (Lignon *et al.*, 2004, *Arch. Mal. Coeur*. **97**, 425) et partiellement abolis par l'atropine (1 mg/kg).

La surexpression des GIRK2 induit une nette sensibilisation des souris à la stimulation  $\alpha 2$ -adrénergique sur le plan de la sédation. A l'opposé, Laklani *et al.* (PNAS. 1997. **94**, 9950-) ont observé l'absence de sédation induite par la MED chez des souris D79N mutées pour le récepteur  $\alpha 2A$ -adrénergique, effet qui passe par une activation des canaux Kir3.2. Les modifications sont plus subtiles au niveau cardiovasculaire. Une partie de ces effets pourrait être due à la présence de récepteurs  $\alpha 2$ -adrénergiques dans le noeud sinusal et les fibres de Purkinje (Zhao *et al.*, 2003. *Acta. Pharmacol. Sin.* **24**, 1217-. ; Stephenson *et al.* 1998. *Eur. J. Pharmacol.* **345**, 261-). Une réaction vagale passant par les centres médullaires pourrait également être mise en cause (Sinclair, 2003. *Can. Vet. J.* 2003. **44**, 885-).

## C5

**L'INVASION DES CELLULES DE MAMMIFERES PAR LES BACTERIES PATHOGENES**

Pascale Cossart

Unité des Interactions bactéries-Cellules  
Institut Pasteur, Paris  
Unité INSERM U604, USC INRA

La majorité des bactéries pathogènes sont extracellulaires, colonisant des surfaces, formant des biofilms, produisant toxines, ou enzymes... Certaines bactéries pathogènes sont intracellulaires, soit qu'elles aient la capacité de résister aux composés bactéricides des cellules macrophagiques soit qu'elles aient mis en place des mécanismes d'entrée dans des cellules qui ne sont normalement pas phagocytaires. Notre laboratoire étudie l'infection par *Listeria monocytogenes*, une bactérie qui est responsable d'infections alimentaires graves et qui est devenue l'un des modèles les plus documentés en ce qui concerne l'invasion des cellules par les bactéries pathogènes. Au cours de l'exposé, nous présenterons les deux protéines majeures d'invasion de *Listeria*, l'internaline et InlB et comment ces deux molécules interagissent avec des molécules de la surface cellulaire pour stimuler les réarrangements du cytosquelette et d'autres événements nécessaires à l'entrée des bactéries. Nous comparerons ces événements à ceux qu'utilisent d'autres bactéries invasives comme *Yersinia*, *Shigella*, ou *Salmonella*. Nous démontrerons aussi que des données acquises *in vitro* sur la spécificité de l'entrée des bactéries dans certaines cellules nous ont amenés à générer un modèle animal pertinent. Les stratégies très sophistiquées mises en place par les bactéries pathogènes pour infecter leur hôte témoignent de la longue coévolution des bactéries et des hôtes qu'elles infectent.

## C6

**INTERFERENCE D'ARN CHEZ LES VEGETAUX : APPLICATIONS ET PERSPECTIVES**

Joël Crèche

UPRES-EA 2106 « Biomolécules et biotechnologie végétale »

Université de Tours Fax : 02 47 27 66 60 – email : joel.creche@univ-tours.fr

L'interférence d'ARN (« RNAi ») met en jeu des ARNs particuliers qui, grâce à des interactions séquence-spécifiques, suppriment l'expression d'un gène. Ce mécanisme découvert récemment connaît un engouement spectaculaire, au moins pour deux raisons. La première, basée sur la constatation que ces processus existent (avec des variantes) chez les végétaux, les fungi et les animaux, suggère une origine très ancienne du phénomène et des fonctions biologiques fondamentales, comme par exemple la défense des génomes contre l'invasion par des parasites génétiques –transposons, virus. La seconde, plus appliquée, découle des perspectives importantes qui s'ouvrent dans le domaine de la génomique fonctionnelle avec l'utilisation du « RNAi » comme un outil puissant permettant l'extinction spécifique de gènes (« gene silencing »).

Il existe au moins trois mécanismes différents dans lesquels des types particuliers d'ARNs peuvent interagir avec des séquences nucléotidiques cibles et conduire au « gene silencing ». Le premier se déroule dans le cytoplasme et aboutit à une inhibition de la traduction de l'ARN cible. Il met en jeu un type particulier d'ARN, les micro ARNs (« miRNAs »). Ces « miRNAs » sont des fragments « simple brin » d'environ 20-25 nt dérivant, *via* l'intervention d'une RNaseIII particulière nommée Dicer, de précurseurs en épingle à cheveux (« hairpin ») formés à partir de régions non-codantes du génôme. Les « miRNAs » s'apparient partiellement avec des séquences cibles situées dans la région non traduite en 3' (3'-UTR) des ARNs messagers matures et bloquent la traduction sans dégrader la molécule d'ARNm. Le second mécanisme est également localisé dans le cytoplasme et fait intervenir un autre type particulier d'ARN, les petits ARNs interférents (siRNAs). Les « siRNAs » sont des petits fragments d'ARN « double brin » de 20-22 nucléotides dérivant, également grâce à l'action du complexe Dicer, d'ARNs « double brin » exogènes, dus par exemple à la présence de transgènes ou de virus dans la cellule. L'intervention d'un second complexe enzymatique RISC (« RNA-induced silencing complexe), clive l'ARNm cible. Ce mécanisme est appelé PTGS (post-transcriptional gene silencing) chez les végétaux ou il a été mis en évidence en premier, « quelling » chez les fungi et RNAi (RNA interference) chez les animaux. Le troisième mécanisme implique également l'action de Dicer sur des ARNs « double brin » mais la cible des petits ARNs produits se situe au niveau du noyau. L'interaction de ces petits ARNs avec des séquences ADNs identiques conduit à des modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et la modification de la structure de la chromatine et des histones. Ce mécanisme, également découvert en premier chez les végétaux, est appelé TGS (transcriptional gene silencing) et aboutit à l'inhibition de la transcription du gène ciblé.

Contrairement aux fungi et aux animaux, les plantes ont conservé intégralement la capacité de mettre en œuvre l'ensemble de ces trois mécanismes. De plus, à l'inverse des insectes et des mammifères, le phénomène peut être considérablement amplifié chez les végétaux grâce à l'action d'ARN polymérase ARN-dépendantes capables de produire de grandes quantités d'ARNs « interférents ». Enfin, la particularité qu'ont les cellules végétales d'être interconnectées entre elles par l'intermédiaire des plasmodesmes est déterminante pour la propagation systémique du signal dans toutes les parties de la plante.

Différentes stratégies (biolistique, agroinfiltration,..) permettent de transformer de manière stable les végétaux avec des constructions « interférentes » générant des ARNs « double brin ». Ces approches ont montré leur efficacité dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans divers processus (différenciation, développement, défense,..). Utilisées à une large échelle pour générer des collections de « mutants RNAi », elles représentent une alternative de choix à la mutagenèse par insertion de T-DNA utilisée actuellement chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*.



## C7

**LA DROSOPHILE, UN MODELE POUR DISSEQUER LES INTERACTIONS HOTE-  
APTHOGENES ET LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE**

Bruno Lemaitre

"Interactions hôte/pathogène chez la drosophile"

Centre de Génétique Moléculaire - Bat 26

CNRS - av de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Tel: 33 (0)1 69 82 32 27 or 31 68 - fax: 33 (0)1 69 82 43 86

e-mail: lemaitre@cgm.cnrs-gif.fr

<http://www.cnrs-gif.fr/cgm/immunity/enindex.html>

Les insectes présentent une réponse immunitaire très efficace. En réponse à une agression microbienne, le corps gras de l'insecte (analogue du foie des mammifères) synthétise toute une batterie de peptides possédant de fortes activités antibactériennes ou antifongiques. Nos travaux ont montré que les mécanismes qui régulent l'induction des gènes codant ces peptides présentent de très fortes similarités avec les mécanismes mis en jeu dans la réponse (non adaptative) innée des mammifères. La drosophile, qui présente l'avantage d'un système immunitaire simple par rapport à celui des vertébrés, et une génétique très performante, apparaît comme un modèle idéal pour mieux comprendre les mécanismes fondamentaux de défense contre les infections. Notre équipe se propose d'utiliser la drosophile comme organisme modèle pour étudier les interactions hôte/bactéries. Nous avons récemment pu isoler des bactéries capables d'infecter la drosophile par voie naturelle.

Nos objectifs sont de:

- (1) rechercher à l'aide de cribles génétiques systématiques les gènes de la drosophile, impliqués dans l'infection et dans les réactions de défense
- (2) de rechercher de nouveaux gènes impliqués dans réponse immunitaire en utilisant la technique des puces à oligonucléotide
- (3) d'identifier les facteurs de virulence des bactéries en utilisant des approches génétiques microbiennes.

Notre but est de développer des systèmes modèles qui permettent une analyse génétique à la fois de l'hôte et du pathogène. De telles approches sont particulièrement adaptées pour comprendre le dialogue moléculaire entre l'hôte et son parasite. L'utilisation de la drosophile permettra de cribler de manière systématique (par mutagenèse) tous les gènes de l'hôte impliqués dans les étapes de l'infection bactérienne.

## C8

## POLITIQUE DE L'AGENCE UNIVERSITAIRE DE LA FRANCOPHONIE EN MATIERE D'APPUI A LA RECHERCHE UNIVERSITAIRE

Philippe Lepoivre

Directeur du bureau Europe de l'Ouest et Maghreb de l'Agence Universitaire de la Francophonie. 12 Bvd Prince Baudouin, 1000 Bruxelles, Belgique

[Philippe.lepoivre@auf.org](mailto:Philippe.lepoivre@auf.org)

L'Agence Universitaire de la Francophonie (ou AUF) réunit près de 520 établissements membres (universités publiques et privées, instituts d'enseignement supérieur, centres ou institutions de recherche) répartis dans 54 pays et sur les cinq continents. L'Agence a pour mission de contribuer à la construction d'un espace universitaire solidaire en étroite partenariat avec les établissements, les enseignants, les chercheurs, les étudiants ainsi que les Etats et gouvernements contributeurs.

Les interventions de l'AUF s'adressent principalement aux universitaires des pays du Sud, étudiants, jeunes professeurs et chercheurs travaillant dans trois grandes thématiques qui sont : (1) Langue française, francophonie et diversité linguistique, (2) Développement et environnement et (3) Aspects de l'Etat de Droit.

A l'intérieur de ces grandes thématiques, les principales actions d'appui à la recherche s'articulent autour (1) de réseaux de chercheurs, (2) de la mobilité dans le cadre de la formation ou le perfectionnement à la recherche, (3) de programmes de recherche et (4) de la participation des universitaires à des manifestations scientifiques.

Pour faciliter les échanges et développer des actions communes entre les communautés scientifiques et universitaires, l'AUF encourage la constitution de réseaux de chercheurs. Ceux-ci lancent des projets collaboratifs, organisent périodiquement des journées scientifiques ou des animations scientifiques régionales et enfin, contribuent à l'élaboration d'outils d'information scientifique et technique. La demande d'adhésion à ces réseaux se fait en ligne par le répertoire des chercheurs de l'AUF ([www.chercheurs.auf.org](http://www.chercheurs.auf.org)).

La deuxième action d'appui à la recherche concerne la mobilité des étudiants (notamment doctorants), des enseignants et des chercheurs (notamment post-doctorants). Ce programme tente de promouvoir des mobilités cohérentes avec les besoins des universités et leur dynamique de développement. Dans le même esprit, les bourses sont attribuées avec le souci du retour du boursier dans sa région d'origine à l'issue de la mobilité.

Les actions de l'AUF en matière de promotion de la recherche se traduisent également par l'appui à des projets de recherche multilatéraux favorisant des transferts de compétences et créant des liens entre établissements d'enseignement supérieur et de recherche du Nord et du Sud. Ces projets (deux ans) sont modestes mais visent à permettre à de jeunes chercheurs d'accéder à un premier financement. Le caractère multilatéral des projets doit être attesté tant par leur présentation que par leur contenu. Les projets sont menés par un réseau d'un minimum de trois universités de pays différents, dont au moins une du Sud (Afrique centrale, Afrique de l'ouest, Asie - Pacifique, Caraïbe, Europe centrale et orientale, Maghreb, Moyen-Orient, Océan Indien).

Enfin, le soutien des universitaires du sud qui font état d'une contribution scientifique à l'occasion de manifestations scientifiques (congrès, colloques, journées scientifiques... ) constitue le dernier volet des appuis qu'apportent l'AUF à la recherche scientifiques.



## C10

**LES DEFENSINES DE MAMMIFERES**Charles Pineau 

Equipe "Acteurs Moléculaires de la Spermatogenèse" - GERHM- Inserm U.625 & Innova Proteomics S.A., Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France.

 : [charles.pineau@rennes.inserm.fr](mailto:charles.pineau@rennes.inserm.fr)

Le système immunitaire inné ou naturel est un système de défense ancestral qui contribue à lui seul à la survie de nombreux organismes, depuis les plus simples micro-organismes multicellulaires, les insectes jusqu'aux oiseaux en passant par les amphibiens. Chez les mammifères supérieurs, il intervient comme première ligne de défense et participe activement à l'établissement de la réponse immunitaire adaptative. Le système immunitaire inné est organisé autour d'effecteurs constitutifs et inductibles de type peptidique et protéique. Ces molécules sont retrouvées lors des étapes clés de la réponse immunitaire innée, à savoir dans les sécrétions des muqueuses les plus exposées aux pathogènes, dans les granules des cellules phagocytaires permettant la destruction du microbe ingéré, mais également en grande quantité sur le site de l'infection pour une action rapide et efficace. Quelques représentants tels que les défensines sont connus quant à eux pour leur rôle dans l'organisation de la réponse immunitaire adaptative, notamment grâce à des propriétés chimiotactiques.

Les défensines sont des peptides cationiques de 20 à 50 acides aminés, très liés d'un point de vue évolutif et arborant un motif de 6 cystéines conservées. Leur structure tridimensionnelle est caractérisée par la présence de trois feuillets  $\beta$ , stabilisés par la formation de trois ponts disulfures intramoléculaires liant les cystéines conservées. Chaque défensine est synthétisée sous la forme d'une pré-pro-défensine dont le clivage permet la libération d'un peptide mature invariablement cationique. Chez les mammifères, les défensines sont classées en 3 grandes familles,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\theta$ , sur la base de la position relative des cystéines conservées et des ponts disulfures résultants, à laquelle s'ajoutent des différences dans les modes d'expression. Ces peptides cationiques présentent une activité antimicrobienne à large spectre, le plus souvent incluant les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, les champignons et quelques virus enveloppés. Cette activité est observée *in vitro* à des concentrations aussi faibles que 1-10  $\mu\text{g/mL}$  et sous des conditions optimales : faible force ionique, faible concentration en cations divalents et en protéines plasmatiques. Les  $\alpha$ -défensines, localisées plus particulièrement dans les granules azurophiles des neutrophiles, dans les organes lymphoïdes et dans les cellules cryptales de l'intestin grêle, participeraient à la défense systémique et intestinale de l'hôte. Les  $\beta$ -défensines quant à elles sont exprimées par de nombreuses cellules épithéliales et participeraient plutôt à la défense des muqueuses.

La résistance des bactéries aux antibiothérapies conventionnelles est aujourd'hui un problème majeur de santé publique. La situation est particulièrement préoccupante en milieu hospitalier avec une progression alarmante des infections nosocomiales. La rapidité et la nature du mode d'action des peptides antimicrobiens parmi lesquels les défensines, leur spectre d'action large et leur quasi-absence de cyto-toxicité envers les cellules eucaryotes, font que ces peptides sont sérieusement évalués en tant qu'alternative possible aux antibiotiques conventionnels. Dans ce contexte, depuis le début des années 1990, un effort de recherche soutenu au niveau international a permis la mise en évidence de plus de 700 molécules naturelles antimicrobiennes à partir d'espèces allant des champignons et protozoaires aux plantes, insectes, poissons, amphibiens et mammifères. Chez ces derniers, si le tractus génital mâle semble représenter une source importante de défensines tant quantitativement que qualitativement, le testicule et l'épididyme sont connus pour exprimer quant à eux des protéines et peptides hautement spécifiques. Ces deux aspects font donc de la sphère génitale mâle une source particulièrement pertinente pour la mise en évidence de nouveaux membres spécifiques de la famille des défensines. Les dernières avancées sur ce modèle biologique original seront discutées en conclusion de cette présentation.

## C11

**LES SYSTEMES DE DEFENSE DES VEGETAUX**

Philippe Simmoneau

Professeur de Microbiologie

UMP PaVé N°77 – Faculté des Sciences, 2 Bd Lavoisier, 49 045 Angers Cedex .

Les plantes dans leur environnement naturel sont perpétuellement soumises à l'agression par de multiples agents potentiellement pathogènes. Cependant, même si le développement de certaines pathologies peut avoir des conséquences non négligeables sur le rendement des cultures, les cas de maladies graves consécutives à l'interaction avec un pathogène sont, d'un point de vue statistique, relativement rares chez les végétaux. Dans le cas de cultures gérées par l'homme, l'usage intensif des pesticides visant à réduire la pression exercée par certains pathogènes sur les plantes peut en partie expliquer ce constat. Toutefois il est bien évident que depuis leur apparition sur notre planète, les plantes n'ont pas attendu l'intervention de l'homme pour se protéger mais ont évolué vers la mise en place de tout un arsenal de défenses contre leurs agresseurs.

Globalement, ce système de protection vise à empêcher la pénétration du parasite, limiter sa progression dans les tissus infectés et neutraliser les déterminants de son pouvoir pathogène. L'une des composantes de ce système de défense est de type constitutif, c'est-à-dire qu'elle est toujours exprimée chez la plante même en l'absence de tout contact avec le parasite. Elle va expliquer en partie pourquoi une espèce végétale donnée ne peut être un hôte que pour un nombre de pathogènes limité (ceux qui sont contre lesquels cette composante constitutive sera inefficace). Quelques exemples seront donnés pour illustrer cette observation.

La seconde composante est de type inductible et ne sera mise en place qu'à la suite d'une interaction entre le pathogène et la plante. Elle suppose donc que celle-ci soit dans une certaine mesure informée de la présence de son agresseur. Des molécules émises à la fois par l'agresseur potentiel et par la plante hôte vont en effet impliquer le déclenchement d'une réaction de défense localisée mais aussi dans certains cas permettre à la plante de réagir de façon systémique. Une fois ces signaux perçus, le métabolisme de la plante va être réorienté vers un métabolisme de protection qui va notamment impliquer la production de métabolites secondaires et de protéines de défense. Les principales composantes de l'arsenal métabolique ainsi mis en place seront décrites.

L'utilisation des connaissances acquises sur ce système de défenses induites dans le cadre de la mise en place de nouvelles stratégies de lutte contre les pathogènes, soit par le biais de la transgénèse, soit par l'utilisation de traitements des cultures par des activateurs de résistance, sera discutée.

## C12

**LES NOUVEAUX CORONAVIRUS HUMAINS**

Astrid Vabret

Laboratoire de Virologie. CHU Caen

En mars 2003, l'OMS lançait une alerte mondiale pour une maladie émergente nommée le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère ou SRAS. Les premiers cas de cette pneumopathie atypique sont apparus dès novembre 2002 dans une province de la Chine du Sud et ont été à l'origine d'environ 8500 cas probables et 800 décès. La fin de la transmission inter-humaine a été déclarée en juillet 2003. Un mois après l'alerte et la mise en place de mesures sanitaires, l'agent responsable est identifié. Il s'agit d'un virus du genre coronavirus, cultivable sur cellules Vero, le SARS-CoV. L'analyse moléculaire montre que ce virus était jusqu'à lors inconnu. Les coronavirus représentent un large groupe de virus à ARN infectant les mammifères et les oiseaux. Une quinzaine d'espèces sont identifiées et divisées en trois groupes antigéniques. Chez l'homme, les coronavirus étaient représentés par 2 souches prototypes nommées 229E et OC43 identifiées dans les années 1960 et appartenant respectivement aux groupes 1 et 2. Jusqu'en 2003, ces virus sont peu connus de la communauté médicale car leur rôle est cantonné à des pathologies respiratoires hautes dites banales. Ces virus sont très difficiles à cultiver, les méthodes diagnostiques les plus appropriées sont les techniques de détection moléculaire. Grâce à une importante collaboration scientifique internationale, les connaissances progressent vite sur le SARS-CoV. Cependant, il persiste de nombreuses questions concernant sa place exacte dans la taxinomie, son (ou ses) hôte(s) naturel(s), le mécanisme qui a permis l'infection de l'homme, la susceptibilité de certains individus et l'existence de « superpropagateurs »... Enfin, les méthodes diagnostiques virologiques restent peu performantes surtout au début de la maladie. Ceci pose un problème en cas de ré-émergence éventuelle. Un an après cet événement, un quatrième coronavirus NL63, est identifié presque simultanément par deux équipes différentes. Il s'agit d'un coronavirus du groupe 1, proche du type 229E, responsable de pathologies respiratoires hautes et basses. Ce pathogène ne semble pas nouveau pour l'homme, même si on ne dispose encore que de rares données. Son identification et le développement d'outils diagnostiques vont permettre de préciser l'étiologie virale d'un certain nombre d'infections respiratoires.

- Albert I., 45  
 Alépée N., 5, 6  
 Alexopoulou L., 7  
 Allie N., 7  
 Alvarez E., 55  
 Augé-Gouillou C., 11  
  
 Balen B., 8  
 Barascu A., 9  
 Bassols J., 54  
 Bastien C., 31  
 Belghazi M., 9, 52  
 Belleannée C., 52  
 Benabed S., 37  
 Bender V., 50  
 Berradi H., 10  
 Besson P., 9, 38, 41  
 Biagini C., 50  
 Bigot Y., 11  
 Blazy F., 50  
 Blesbois E., 12, 39  
 Blin M., 30  
 Bolte J., 18, 32  
 Bonnet M.-C., 6, 47, 50, 54  
 Borde F., 50  
 Boudvillain M., 49  
 Bougnoux P., 9, 38  
 Boursier C., 52  
 Bouskila M., 50  
 Brignolas F., 31  
 Brillet., 11  
 Brizard P., 50  
 Bromet N., 25, 29  
 Brömme D., 21, 26  
 Bruneau C., 12  
 Bucher F., 43  
  
 Cagliero C., 13, 14  
 Canton M., 30  
 Carpentier G., 55  
 Cassio D., 50  
 Catoire S., 5, 6  
 Causevic A., 23  
 Chevalier S., 5, 6, 37, 47, 50  
 Chbab N., 57  
 Chouikha I., 56  
  
 Cloeckaert A., 14  
 Cochet P., 25  
 Cossart P., 45  
 Couillin I., 15, 34  
 Coursaget P., 55  
 Crépieux P., 24, 27  
  
 Dacheux F., 52, 54  
 Dacheux J.-L., 9, 51, 52, 54  
 Daguès N., 37  
 Decoville M., 16  
 Decrop M., 35  
 Delaunay A., 23  
 Delmotte F. M., 31  
 De Monte M., 21  
 Desbois., 8  
 Desmazes C., 22, 36  
 Diot P., 21  
 Domingo I., 6  
 Dreyer E., 31  
 Druart X., 52  
 Duchene S., 46  
 Dupont J., 17, 33, 46  
 Duverger E., 42  
  
 El Wafi M., 18, 32  
 Erard., 48  
 Ernouf D., 35  
 Esnard A., 36  
 Esnard F., 36  
  
 Federighi M., 13  
 Fleury M., 55  
 Fontaine I., 27  
 Francineau A., 57  
 Fremond C., 19  
 Froment P., 33  
  
 Gadzovska S., 20  
 Gantat P., 53  
 Gatti J.-L., 51, 52  
 Gauthier C., 27  
 Gefflaut T., 18, 32  
 Genin E., 29  
 Germon P., 56  
 Godat E., 22, 26  
  
 Gombault A., 16  
 Gracieux P., 45  
 Grasseau I., 39  
 Grépinet O., 45  
 Gruel Y., 41  
 Guégnard F., 39  
 Guérin M., 40  
 Guillou F., 23, 27  
 Guillon S., 53  
 Guyetant S., 36  
  
 Hagège D., 20, 23  
 Hano C., 20  
 Hanton G., 37  
 Herbet A., 6  
 Hévor T.-K., 40  
 Hilt R.-J., 25  
 Hougham C., 47  
  
 Jacobs M., 7, 15, 19, 43  
 Janot L., 48  
 Jorge V., 31  
 Joseph C., 20  
 Jourdan M-L, 9, 12  
  
 Kamiri M., 23  
 Kara E., 24, 27  
 Kerboeuf D., 39  
 Kieda C., 44  
 Kissinger C.-B., 25, 29  
 Kissinger P.-T., 25, 29  
 Koch C., 39  
 Kollias G., 7  
 Krsnik-Rasol M., 8  
  
 Lacour S., 21  
 Lagelle F., 50  
 Lalmanach G., 21, 26  
 Lamblin F., 20  
 Lantier F., 28  
 Lantier I., 28  
 Lapouble E., 18  
 Laroche M., 13  
 Leblond V., 21  
 Le Floch O., 9

- Le Guellec S., 21  
 Le Guen S., 29  
 Le Guennec J-Y,38,41  
 Le Vern Y., 39  
 Lecaille F., 22, 26  
 Lécureuil C., 27  
 Ledieu D., 37  
 Lefebvre M., 23  
 Lefort J., 15  
 Locker D., 16  
  
 Magdalaine C., 30  
 Magras C., 13  
 Maillet I., 15, 34, 48  
 Marc D., 28  
 Marion S., 24  
 Martinat N., 27  
 Masson M.-T., 6, 47, 50  
 Maurel M.-C., 14, 28, 55  
 Maury S., 20, 23  
 Mercey R., 28  
 Meunier L., 29  
 Michel O., 30  
 Mignot A., 6, 50  
 Mompon P.-R., 47  
 Monclus R., 31  
 Monsigny M., 42  
 Montbroussou E., 6, 50  
 Montecot-Dubourg C.,18,32  
 Moreau C., 33  
 Moreau V., 33  
 Moser R., 15, 43  
 Moulard M., 30  
 Moulin-Schouleur M., 56  
  
 Nicaise L., 50  
 Nicolle D., 19  
 Noulin N., 34  
 Nuttall P., 15  
  
 Oudin A., 35  
  
 Pacaud-Mercier K,30  
 Paesen G., 15  
 Panel V., 36  
 Parrod M., 25, 29  
 Paul G., 29  
 Pawlowski V., 37  
 Payot S., 13, 14  
 Peter-Katalinic J, 8  
 Pichon J., 18, 32  
 Potier M., 38  
  
 Quesniaux V,7,19,34,43,48  
  
 Rahmouni R., 49  
 Rapailles A., 16  
 Reiter E., 24, 27  
 Resina S., 32  
 Richard O., 18, 32  
 Rideau N., 10, 53  
 Riou M., 39  
 Robert F., 40  
 Roche A.-C., 42  
 Roche S., 45  
 Rodde F., 47  
 Roger S., 38, 41  
 Rollin J., 41  
 Rondanino C., 42  
 Ryffel B,7,15,19,34,43,48  
  
 Schnyder B., 43  
 Schouler C., 56  
 Schoentgen F., 44  
 Slaughter M., 47  
 Sobry C., 37, 47  
 Sow A., 27  
 Spasenoski M., 20  
  
 Taouis M., 10  
 Temoin S., 45  
 Tesseraud S., 27, 46  
 Thiersault M., 53  
 Thimon V., 51  
 Tilloy A., 47  
 Torres D., 43, 48  
 Touzé A., 55  
 Trémouillaux-Guiller J.53  
  
 Vakhrushev S., 8  
 Vandier C., 21,26,38  
 Vargaftig B., 15,34  
 Vaudin P., 46  
 Vautherot J-F., 55, 57  
 Velge P., 45  
 Villar M., 31  
  
 Walmacq C., 49  
 Watier H., 12, 30  
 Weston-Davies W., 15  
  
 Yermeev V.,7,19,43  
  
 Zadro I., 8  
 Zhu Y., 25