

Le 18^{ème} colloque de Biotechnocentre se tiendra les 3 et 4 novembre et pour la seconde fois au domaine de Fondjouan. Nous avons fait le maximum pour ne pas renouveler les erreurs de l'an dernier mais comme toujours, nous serons à l'écoute de vos remarques et commentaires sur l'organisation.

Je tiens à remercier tous ceux qui permettent l'organisation matérielle de cette manifestation : le Conseil Régional de la région Centre dont le soutien financier est indispensable pour la tenue de ce colloque mais aussi les entreprises dont l'aide financière et la participation sont très appréciées. Ces entreprises seront cette année localisées à un endroit plus accessible de façon à ce que l'ensemble des participants puisse, comme nous le souhaitons, leur rendre visite.

Vous pouvez voir à la lecture du programme qu'il est très prometteur sur le plan scientifique : l'un des thèmes principaux est la cancérologie et nous aurons également le plaisir d'entendre nos collègues de la Région Centre présenter les développements les plus récents en Biotechnologie.

Ne manquez pas de consulter les affiches, souvent sources d'échanges fructueux et de mise en place de coopérations : huit d'entre elles seront présentées oralement par des étudiants en 2^{ème} ou 3^{ème} année de thèse. Nous entendrons également quatre présentations des projets de recherche soumis au Conseil Régional.

Nous comptons sur vous pour assurer le succès de ce 18^{ème} colloque, démontrer clairement le dynamisme de la recherche dans notre région Centre et contribuer à l'augmentation des collaborations entre ses différents acteurs.

Bon colloque Biotechnocentre 2005

Daniel LOCKER

Président de Biotechnocentre

Résumés des Posters.....	1
Résumés des Conférences.....	35
Index des Auteurs.....	43

POSTERS

- P1 - Characterisation of an airway epithelium model to assess pulmonary irritancy in vitro.**
N. Alépée, S. Catoire, E. Boissel, F. Borde, S. Blond, MT Masson, MC Bonnet, and S. Chevalier. 4
- P2 - Phototoxicity testing: Relevance of the 3T3-NRU assay for UVB absorbers**
N. Alépée, I. Domingo, C. Biagini and S. Chevalier 5
- P3 - Les acides gras oméga-3 diminuent la prolifération des cellules épithéliales ammaires MDAMB-231 en inhibant l'activité du complexe CDK1-cycline B1.**
A. Barascu, P. Besson, O. Le Floch, P. Bougnoux, M-L. Jourdan. 6
- P4 - Purification and Identification of sperm surface proteins related to sperm maturation**
C. Belleannée, M. Belghazi, V. Labas, C. Boursier, X. Druart, J-L. Dacheux, F. Dacheux.... 7
- P5 - Validation d'un nouveau réactif de coloration hautement sensible**
M. Blin, J. Blin, R. Bouguarne, J. Hachani et K. Pacaud-Mercier...... 8
- P6 - Cancer cérébral et protéomique : modifications générées par des ADN antisens iblant le métabolisme glucidique dans les glioblastomes**
M. Blin, K. Mercier, J. Hachani, T. Dufour, M. Canton, J-F Cloix et M. Ardourel...... 9
- P7 - Impact de la sécheresse sur les profils d'expression protéique de deux génotypes de peupliers contrastés pour leur efficience d'utilisation de l'eau**
L. Bonhomme1, R. Monclus, F. Brignolas, M. Villar, M. Krsnik-Rasol et D. Morabito...... 10
- P8 - Diversité de l'efficience de l'utilisation de l'eau chez les peupliers euraméricains**
F. Brignolas, N. Marron, R. Monclus, L. Bonhomme, M. Villar, E. Dreyer, D. Meese, D. Morabito et C. Barbaroux...... 11
- P9 - Oocyte – cumulus dialog: a real time PCR and protein approach**
V. Cadoret, R. Dalbies-Tran, F. Guerif, D. Royere 12
- P10 - Bases structurales de la reconnaissance spécifique des purines oxydées de l'ADN par la Fomamidopyrimidine-ADN glycosylase**
B. Castaing, F. Coste, M. Ober, T. Carell and C. Zelwer...... 13
- P11 - Identification, Function and Regulation of Train A (RNase 10) : a New Epididymal-Specific RNase-A like protein**
S. Castella, J-L. Dacheux, F. Dacheux...... 14
- P12 - Chemokine-glycosaminoglycan interactions participate to the endothelium organospecificity and cellular addressing**
C. Crola Da Silva, N. Lamerant-Fayel, C. Kieda,..... 15
- P13 - Human epididymal secretome and proteome**
JL. Dacheux, M. Belghazi, Y. Lanson, F. Dacheux...... 16

P14 - Epigénétique ou comment les cellules se souviennent.	
<i>M. Decoville.....</i>	17
P15 – Toxicité radicalaire de l'héтанol et hépatopathies	
<i>C.Eichwald-Grondeux, E. Rabut, D. Ernouf.....</i>	18
P16 - Glycosylated Polyethylenimines for in vivo Gene Delivery in the Mouse Lung	
<i>I. Fajac, S. Grosse, G. Thévenot, M. Abdelkarim, M. Monsigny.....</i>	19
P17 - Production de pseudovirions du papillomavirus humain de type 31 par transfection de cellules de mammifère avec des gènes de synthèse dont les codons ont été optimisés	
<i>M.J.J. Fleury, A. Touzé et P. Coursaget.....</i>	20
P18 - Etude fonctionnelle comparative de la sous-unité ARN télomérase virale basées sur des mutations « naturelles »	
<i>L. Fragnet.,E. Kut et D. Rasschaert</i>	21
P19 – Identification d'inhibiteurs de la transposase de l'élément Mariner Mos-1.	
<i>S. Germon, C. Tissandier, Y. Bigot, M. Dubernet, J. Guillard, M.C Viaud-Masssuard.....</i>	22
P20 - Multiple roles for beta-arrestins in FSH signalling : a 5 Ser/Thr cluster in the C-terminus of the receptor is important for beta-arrestin recruitment, desensitization and internalization but not for beta-arrestin-mediated Erk activation.	
<i>E. Kara, P. Crepieux, C. Gauthier, N. Martinat, V. Piketty, F. Guillou, E. Reiter.....</i>	23
P21 - Glycosylation de la gonadotropine équine (eLH/CG) et de ses sous-unités produites en cellules d'insectes Sf9 et MimicTM	
<i>S. Legardinier, D. Klett, J-C Poirier, Y. Combarnous, C. Cahoreau.....</i>	24
P22 - Évaluation biologique in vitro de nanoformulations superparamagnétiques pour la chimiothérapie des cancers	
<i>É. Munnier; S. Cohen-Jonathan; C. Linassier ; L. Douziech-Eyrolles ; M. Soucé; H. Marchais; L. N'Gaboni Okassa ; J-F Fouquenet ; P. Dubois ; I. Chourpa.....</i>	25
P23 - Preparation et caractérisation de nanoparticules composites superparamagnétiques	
<i>L. Ngaboni Okassaa,b, H. Marchaisa, L. Douziech-Eyrollesb, S. Cohen-Jonathanb, E. Munnierb, M. Soucéb, C. Linassierc, P. Duboisb, I. Chourpab.....</i>	26
P24 - Phylogenetic relationships between extra-intestinal pathogenic Escherichia coli of human and avian origin	
<i>M. Répérant, S. Laurent, D. Rasschaert, C. Schouler, P. Germon, E. Denamur, R. Quentin, M. Moulin-Schouleur.....</i>	27
P25 - Synthetic Glycocluster-Melan A Peptide Conjugates: Dendritic Cell Targeting for Cellular Vaccination	
<i>O. Srinivas, P. Larrieu, E. Duverger, A-C Roche, M. Monsigny, F Jotereau, J-F Fonteneau</i>	28
P26 - Digestion enzymatique sur billes paramagnétiques avant analyse par spectrométrie de masse.	
<i>S. Tigrett, M. Canton et K. Pacaud-Mercier.....</i>	29

P27 - Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to Listeria Infection <i>D. Torres, L. Janot, V. J.F. Quesniaux, S. Grivennikov, I. Maillet, J. D. Sedgwick, B. Ryffel, F. Erard.....</i>	30
P28 - Expression et rôle de l'AMP protein Kinase (AMPK) dans les cellules de la granulosa issues de différents types de follicules pré-ovulatoires chez la poule <i>L. Tosca1, S. Crochet, P. Ferré, F. Foufelle, S. Tesseraud1 et J. Dupont.....</i>	31
P29 - Effets de la Metformine sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa chez la rate : implication de l'AMP-activated protein Kinase (AMPK) ? <i>L. Tosca, P. Solnais et J. Dupont</i>	32
P30 – Sélection assistée par marqueurs chez la betterave sucrière : rôle de l'epigenetique. <i>M-V. Gentil, A. Delaunay.,C. Joseph.,D. Hagège,S. Barnes, M. Lefebvre,S. Maury</i>	33.
P31 - Does transferrin or transferrin derivatives participate to phagocytosis in Sertoli cells? <i>M-G. Yefimova.,I. Fontaine,F. Guillou</i>	34

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

Nathalie Alépée, S. Catoire, E. Boissel, F. Borde, S. Blond, MT Masson, MC Bonnet, and S. Chevalier.

Pfizer *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. The aim of inhalation of drugs in therapy of pulmonary diseases such as asthma is to increase local drug concentrations and decrease systemic bioavailability of these compounds. For this purpose, pulmonary local tolerance of inhaled drugs has to be investigated. Despite increasing interest in drug delivery via the lung, there is currently no widely accepted cell culture model to address this issue. Three human bronchial *in vitro* cell cultures (16HBE14o, Calu-3 and BEAS-2B) of the airway epithelium have been suggested to be suitable models to investigate pulmonary drug absorption and metabolism (Forbes, 2000). They were not investigated for their potential to assess pulmonary tolerance.

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). Calu-3 cells when placed at the air-liquid interface to form a 3-dimensional epithelium model and to develop tight junctions and functional barrier properties. This model also induces ciliogenesis and produces mucus in our culture conditions.

To determine the relevance and the reliability of this *in vitro* model, 8 chemicals intended for the treatment of COPD/asthma were tested in the Calu-3 model. A multiple end-point analysis approach was used and cell viability (MTT), inflammatory responses (interleukines and chemokines), tight junction disruption (trans-epithelial resistance) and production of mucin secretion on the apical side of the model were measured.

Phototoxicity testing: Relevance of the 3T3-NRU assay for UVB absorbers

Nathalie Alépée, Isabelle Domingo, Christine Biagini and Stephan Chevalier

Safety Science Europe Pfizer Global Research and Development, MCT, BP159, 374001 Amboise, France

Many types of chemicals have been reported to induce phototoxic effects. They all absorb radiation in the wavelength range of 290 –700 nm and are distributed in sun-exposed tissues. The *in vitro* 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test is based on a comparison of the cytotoxicity of a compound when tested in the presence and absence of exposure to UVA light. This assay was recently adopted by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA/CPMP, 2002¹) and the Food and Drug Administration (FDA/CDER, 2003²) for guidance on photosafety testing. The 3T3-NRU phototoxicity test was shown to be predictive of acute effects in animals and in human for UVA/visible absorbers (Spielmann et al, 1998³). Positive Chemicals in this test are highly likely to be phototoxic *in vivo* following systemic or topical applications (OECD, 2002⁴). In order to determine the reliability and relevance of this assay for strict UVB absorbers, 9 chemicals that absorb in UVB range only were tested in which 7/9 have been reported to be photo-irritants *in vivo*. The correlation between in-vivo published data and those obtained with the 3T3-NRU *in vitro* assay will be shown.

¹ Note for the Guidance of Photosafety Testing (CPMP/SWP/398/01). CPMP, December 2002

² Guidance for Industry: Photosafety testing, FDA, CDER, May 2003

³ Spielmann, H. et al. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: Results of phase II (blind trial). Part1: The 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicol. in Vitro* 12, 305-327, 1998.

⁴ OECD guideline for testing of chemicals. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Draft proposal for a new guideline: 432, March 2002.

Les acides gras oméga-3 diminuent la prolifération des cellules épithéliales mammaires MDA-MB-231 en inhibant l'activité du complexe CDK1-cycline B1.

Aurélia Barascu, Pierre Besson, Olivier Le Floch, Philippe Bounoux, Marie-Lise Jourdan.

Inserm E0211 « Nutrition, Croissance et Cancer »

Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex.

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 mais les mécanismes restent inconnus. En synchronisant les cellules MDA-MB-231 dans le cycle cellulaire, nous avons montré que le DHA et l'EPA ralentissent la progression de la phase G2 à la phase M. A l'inverse, les phases G1 et S ne sont pas affectées. Les taux des protéines impliquées dans la progression de G2 à M, cycline A, B1 et cyclin-dépendent kinase 1 (CDK1), sont tous diminués par le DHA ou l'EPA. Comme la cycline A (complexée à CDK2) intervient également en S sans que celle-ci soit ralentie par les oméga-3, le taux diminué de cycline A semble être suffisant pour le bon déroulement du cycle. Cycline B1 et CDK1 restent les meilleures candidates pour expliquer l'effet anti-prolifératif de l'EPA et du DHA. Le complexe CDK1-cycline B1 étant activé par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation, nous avons mesuré l'expression de la cycline B1 phosphorylée sur la sérine 126 ainsi que de la phosphatase CDC25C qui déphosphoryle la CDK1 sur la thréonine 14 et la tyrosine 15. Le DHA et l'EPA diminuent le taux de ces deux protéines. Ces résultats suggèrent que le DHA et l'EPA inhibent la prolifération des cellules mammaires en diminuant l'activité du complexe CDK1-cycline B1.

PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF SPERM SURFACE PROTEINS RELATED TO SPERM MATURATION

C. Belleannée⁽¹⁾, M. Belghazi⁽²⁾, V. Labas⁽²⁾, C. Boursier⁽²⁾, X. Druart⁽¹⁾, J-L. Dacheux⁽¹⁾, F. Dacheux⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours, 37380 Nouzilly, France, ⁽²⁾ Service de Spectrométrie de Masse pour la Protéomique, INRA, 37380 Nouzilly

Mammalian sperm differentiation and maturation occurs during the transit through the epididymis where spermatozoa acquire their motility and fertility. Epididymal maturation involved the progressive loss of most of the testicular sperm surface proteins and gain of new transient or permanent proteins on the surface membrane of mature and fertile spermatozoa. The aim of this work was to identify these sperm surface modifications in several domestic animals (boar, bull and ram).

Spermatozoa samples were collected all along the epididymis by microperfusion and washed on percoll gradient to remove any luminal epididymal protein contamination. Surface proteins of the gametes were labelled with sulfo-NHS-SS-biotin. Differential extractions of surface proteins were realised on intact sperm and on isolated membrane obtained by nitrogen cavitation. Peripheral proteins (low affinity membrane-bounded proteins) were released with high ionic salt buffer and integral proteins were extracted with a non-ionic detergent.

The biotinylated proteins from these different extracts were affinity purified on streptavidin column and separated by one and two dimensional gel electrophoresis (IEF/SDS-PAGE). Identification of the different proteins was done by mass spectrometry (MALDI-TOF and nano LC MS/MS).

Between mature and immature spermatozoa, several different surface proteins have been electrophoretically characterized and most of them have been identified by MS. Comparative analyses between species were carried out.

This systematic identification on several species shows that important modifications occurred both on the surface membrane and in the inner membrane of spermatozoa during epididymal maturation. Several of these proteins modifications may be associated with sperm fertility and potentially can be used as markers either in animal selection or human fertility pathology.

Validation d'un nouveau réactif de coloration hautement sensible

Marion Blin, Julie Blin, Rédouane Bouguarne, Johan Hachani et Karine Pacaud-Mercier

Agro-Bio, Rue Denis Papin, La Chavannerie, 45240 La Ferté Saint Aubin

La protéomique est devenue incontournable pour la biologie et la médecine depuis l'achèvement du séquençage du « génome humain ». A la différence des gènes, qui sont constants, les protéines varient en permanence et sont les véritables effecteurs des mécanismes biologiques.

L'une des étapes permettant d'accéder à l'identification des protéines est leur séparation par électrophorèse bidimensionnelle (2D). Afin de visualiser les protéines, il est nécessaire d'effectuer une révélation par coloration. La coloration au nitrate d'argent est largement utilisée depuis ses premières applications (1979) pour ses qualités de sensibilité (seuil limite de détection estimé à quelques nanogrammes). Cependant, de part les modifications irréversibles apportées aux protéines, elle demeure inadaptée à l'identification protéique par spectrométrie de masse. Pour pallier à cet inconvénient, sont apparues, depuis quelques années, des techniques de coloration compatibles avec la spectrométrie de masse, dont les caractéristiques en terme de sensibilité et de résolution sont proches de la coloration au nitrate d'argent.

Le bleu de coomassie® colloïdal (BCC) accroît ainsi nettement la sensibilité de détection du bleu de coomassie® « classique ». La coloration au « sypro ruby® » et les fluorophores utilisés en DIGE montrent des potentialités certaines de sensibilité et de reproductibilité mais souffrent encore de coûts excessifs d'utilisation.

Agro-Bio a donc développé son propre réactif de coloration au bleu de coomassie colloïdal qui présente une sensibilité et une résolution augmentées tout en conservant des temps de coloration très courts. La sensibilité de cette coloration a été testée sur une gamme de BSA et montre une sensibilité de 5 ng.

Cancer cérébral et protéomique : modifications générées par des ADN antisens ciblant le métabolisme glucidique dans les glioblastomes

Marion Blin¹, Karine Mercier¹, Johan Hachani¹, Thierry Dufour³, Michel Canton¹, Jean-François Cloix² et Maryvonne Ardourel²

¹Agro-bio, rue Denis Papin, la Chavannerie, 45240 La Ferté Saint Aubin

²Laboratoire de Neurobiologie, UPRES EA 2633, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans CEDEX 2

³Service de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, 45071 Orléans CEDEX 2

Les glioblastomes multiformes (GBM), classe la plus fréquente et la plus agressive des tumeurs cérébrales malignes, se caractérisent par un caractère invasif et prolifératif très important. Quels que soient les modes thérapeutiques employés (chirurgie seule ou associée à une chimio-radio-thérapie), le pronostic de ce type de tumeur est toujours négatif (médiane de survie de 13 mois, espérance de vie nulle à 5 ans). Des anomalies du métabolisme glucidique, tel un taux anormalement élevé de glycogène, ont été décrites dans les glioblastomes,.

En vue d'une thérapie génique de ce type de tumeur, nous avons modulé, par une stratégie ADNc antisens, le taux de glycogène d'une lignée cellulaire humaine de glioblastome. Nous avons montré que des ADNc antisens dirigés contre des enzymes impliquées directement ou indirectement dans la synthèse du glycogène induisent une diminution de l'invasion et de la prolifération cellulaires. Grâce à une analyse protéomique de ces cellules (électrophorèses 2D puis analyse par spectrométrie de masse), nous avons pu montrer que cette diminution est associée à une modification du taux des protéines impliquées notamment dans l'apoptose. De façon très intéressante, ces ADNc antisens modifient aussi l'expression de protéines liées au grade de la tumeur.

Par conséquent, cette approche protéomique nous permet de valider notre stratégie ADNc antisens ciblant le métabolisme glucidique comme agent thérapeutique ou diagnostique de ce type de tumeur.

Impact de la sécheresse sur les profils d'expression protéique de deux géotypes de peupliers contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau

L. Bonhomme¹, R. Monclus^{1,2,3}, F. Brignolas^{1*}, M. Villar², M. Krsnik-Rasol⁴ et D. Morabito¹

¹Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, FRANCE

²Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, INRA Orléans, BP20619, 45166 Olivet, FRANCE

³UMR INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières, INRA Nancy, 54380 Champenoux, FRANCE

⁴Department of Molecular Biology, University of Zagreb, Horvatovac 102A HR-10000, Zagreb, CROATIA

*franck.brignolas@univ-orleans.fr

Des études récentes focalisées sur des géotypes *Populus x euramericana* ont montré un fort degré de variabilité pour l'efficacité d'utilisation de l'eau. Cette variabilité d'efficacité d'utilisation de l'eau reflète une diversité dans l'expression des mécanismes physiologiques associés à ce caractère. La variabilité de ces mécanismes a été abordée par l'étude des protéines foliaires. Dans la perspective d'associer la diversité d'efficacité d'utilisation de l'eau à la diversité des profils protéiques, l'objectif de ce travail a consisté à déterminer si des géotypes contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau diffèrent d'une part, par leur profil d'expression protéique foliaire et d'autre part, par la modulation de ces profils en réponse à une sécheresse. Cette étude portait sur 2 géotypes de peupliers euraméricains, 'Agathe_F' et 'Cima', le premier se caractérisant par une plus forte efficacité d'utilisation de l'eau. Ces 2 cultivars ont été soumis de juin à septembre 2004 à une sécheresse progressive et modérée réalisée en pépinière. Les protéines foliaires ont été extraites, dosées globalement, puis analysées par électrophorèse bidimensionnelle et quantifiées par analyse d'image. En condition hydrique non limitante, plus de 800 polypeptides ont été détectés, 2 étaient spécifiques à 'Agathe_F' et 45 discriminaient les 2 géotypes. En réponse à la sécheresse, une baisse significative des teneurs en protéines totales a été observée pour les 2 géotypes. Parmi les polypeptides détectés, 36 variaient chez 'Agathe_F' et 28 chez 'Cima'. Ce travail se poursuit par une thèse financée par le Conseil Régional Région Centre avec les objectifs suivants : 1/ confirmer la diversité génotypique des profils protéiques et ses liens avec l'efficacité d'utilisation de l'eau et 2/ repérer les polypeptides probablement impliqués dans les mécanismes de réponse à la sécheresse.

Diversité de l'efficacité de l'utilisation de l'eau chez les peupliers euraméricains

F. Brignolas^{1*}, N. Marron^{1,2}, R. Monclus^{1,3,4}, L. Bonhomme¹, M. Villar³, E. Dreyer⁴, D. Meese⁵,
D. Morabito¹ et C. Barbaroux¹

¹Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, FRANCE

²Present address: University of Antwerp (UA), Department of Biology, Campus Drie Eiken, Research Group of Plant and Vegetation Ecology, Universiteitsplein 1, B-2610, Wilrijk, BELGIUM

³Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, INRA Orléans, BP20619, 45166 Olivet, FRANCE

⁴UMR INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières, INRA Nancy, 54380 Champenoux, FRANCE

⁵ Moulin de Bariteau, 86120 Beuxes, FRANCE (<http://www.bariteau.org>)

*franck.brignolas@univ-orleans.fr

La baisse des précipitations estivales prévue pour le XXI^{ème} siècle est propice au développement de périodes de sécheresses, plus intenses et plus durables, comparables à celle observée en 2003. Les prévisions indiquent que ces modifications climatiques pourraient entraîner une baisse substantielle de la production de bois, particulièrement dans le cas des espèces ligneuses à courtes rotations telles que le peuplier. Des études récentes, menées en serre et en pépinière sur les principaux hybrides commercialisés en Europe (*Populus x euramericana*), ont montré d'une part, que tous les cultivars ne consomment pas la même quantité d'eau pour produire la même quantité de biomasse et d'autre part, que les génotypes les plus productifs ne sont pas forcément les plus grands consommateurs d'eau. Le rapport entre la biomasse produite et l'eau consommée pendant le même laps de temps est appelé efficacité d'utilisation de l'eau (W). Au niveau des feuilles, W peut être apprécié directement par le rapport entre assimilation nette de CO₂ et conductance stomatique ou indirectement par la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone (Δ) de la matière organique. Toutes expériences confondues, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre Δ et productivité, ce qui suggère la possibilité de sélectionner des génotypes productifs et efficaces. Compte tenu de l'héritabilité importante de Δ et de la stabilité interannuelle des différences entre génotypes pour ce critère, Δ pourrait s'avérer être un outil simple de sélection des génotypes efficaces. Dans cette perspective, il reste néanmoins à vérifier que l'expression de la diversité génotypique pour Δ est maintenue quelque soit l'âge des plants et la nature du sol. Cette validation correspond aux objectifs écophysiologiques majeurs du contrat biotechnocentre¹ que nous avons déposé en 2005. Les expériences relatives à ce contrat seront réalisées à l'Observatoire Populicole de Bariteau (200 ha ; 35000 peupliers ; 250 génotypes).

¹ « Diversité de l'efficacité de l'utilisation de l'eau chez le peuplier, relation avec la diversité et les dégâts de l'entomofaune associée. »

Oocyte – cumulus dialog: a real time PCR and protein approach

Cadoret V., Dalbies-Tran R, Guerif F., Royere D.

Reproductive Medecine & Biology, Dept of Obs-Gyn & Human Reproduction.

UMR6175 Inra / Cnrs / University Hospital, Tours, France.

Introduction

Identification of parameters which might allow to define oocyte competence for embryo development remains a major goal in reproductive biology and ART procedure. The dialog between oocyte and surrounding cumulus cells has a peculiar role in oocyte maturation, while cumulus cells remain easy to access in human. Preliminary studies led us to identify various differentiation factors, such as connexine 43 (Cx43) which was clearly hyperphosphorylated after the hCG injection as well as cyclooxygenase 2 and StAR at the protein and mRNA level. The aim of this study was to evaluate the expression of these lately appeared factors at the mRNA and protein level in human cumulus cells during ICSI procedure, depending on the nuclear or cytoplasmic maturation level of the oocytes.

Materials and methods

Cumulus cells were harvested during ICSI procedures following enzymatic and mechanical treatment, while oocytes maturity and competence for fertilization and development were later registered. Identification of differentiation factors (Cox2, StAR) was processed using western-blotting and real-time PCR.

Results

StAR and Cox2 were identified at the protein level, with an apparent increase in StAR expression as oocytes nuclear maturation progressed, using StAR / actin ratio for quantification. Real time PCR was optimized to allow quantitative analysis from 0.0001 to 0.1 cumulus equivalent. Higher expression of StAR mRNA was observed as compared to Cox2 mRNA. Quantitative analysis involved 18S RNA and actine as house-keeping genes. Differential expression depending on the developmental ability of the embryos will be detailed.

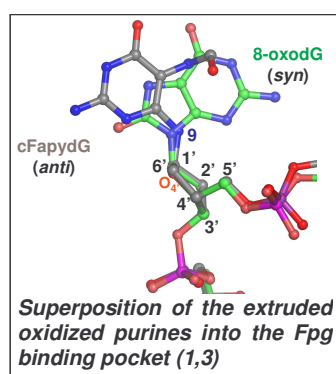
Conclusion

Real time PCR gave us the opportunity to quantitatively assess the expression of StAR and Cox2 mRNA at the level of a single cumulus in order to follow up their changes as oocyte competence increased. Other possible candidates more directly involved in oocyte competence are currently under study.

Bases structurales de la reconnaissance spécifique des purines oxydées de l'ADN par la Formamidopyrimidine-ADN glycosylase

Bertrand Castaing, Franck Coste, Matthias Ober[¶], Thomas Carell[¶] and Charles Zelwer
 Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, France and [¶]Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians University Munich, 5-13, D-81377 Munich, Germany

La Formamidopyrimidine-ADN glycosylase (Fpg) est un enzyme de réparation de l'ADN spécialisée dans l'élimination des purines oxydées de l'ADN telles que le produit majeur d'oxydation des purines, la 8-oxoguanine (8-oxoG, lésion mutagène associée à des transversions G→T) et les résidus formamidopyrimidiques (Fapys, purines à cycle imidazole ouvert, lésions potentiellement létales car elles bloquent l'ADN polymérase, *in vitro*, une base avant la lésion). Nous avons résolu la structure cristallographique d'un complexe abortif entre Fpg et un oligonucléotide de 14 paires de bases contenant un dérivé carbocyclique du 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, le cFapydG. La structure du complexe indique que le cFapydG est stabilisé en position extrahélical à l'intérieur de la poche du site actif de l'enzyme. Alors que la 8-oxodG est stabilisée en conformation *syn* dans la poche du site actif, le cFapydG est lié par



l'enzyme en conformation *anti*. Plus précisément, Fpg établit des interactions avec tous les donneurs et accepteurs de proton du cFapydG qui peuvent être regroupées en 2 catégories : (i) les interactions spécifiant une purine (ici une guanine oxydée) impliquée dans la reconnaissance de la face Watson-Crick de la lésion et contribuant probablement à une orientation optimal du cycle pyrimidique du cFapydG et (ii) les interactions spécifiant le cycle imidazole ouvert du cFapydG et sa conformation rotamérique. Ces

interactions impliquent des résidus d'acides aminés strictement conservés dans les séquences peptidiques des Fpgs et des molécules d'eau structurales que l'on retrouve dans la plus part des modèles cristallographiques des complexes Fpg/ADN. Les différences significatives entre les modes de reconnaissance de la 8-oxodG et du FapydG apportent de nouveaux éléments sur la spécificité de substrat de l'enzyme.

Coste, F., Ober, M., Carell, T., Boiteux, S., Zelwer, C. & Castaing, B. "Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by the Fpg DNA glycosylase"

J. Biol. Chem. (2004) **279**, 44074-44083.

Identification, Function and Regulation of Train A (RNASE 10) : a New Epididymal-Specific RNASE-A like protein

S. Castella, J-L. Dacheux , F. Dacheux

UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

Mammalian spermatozoa acquire the ability to fertilize oocytes during their transit through the epididymis, a long tube of several meters. Most of the proteins secreted in the lumen are produced by the epithelium of the proximal region of this organ, and several of them are secreted in abundance. Among the proteins identified, the most abundant one secreted in the anterior part of the boar epididymis is “Train A”, a new member of a new RNase A family, now registered as RNase 10 [1].

Train A presents a ribonuclease A family motif in its sequence. However, the presence of a long conserved N-terminal specific sequence and the absence of RNase catalytic site for Train A indicate that Train A protein is a member of a new family of RNase A. RNase A activity was analyzed both for a recombinant Train A protein in the fluids of the testis and for different epididymal regions, but in no case this protein was found to have RNase A activity.

The protein was present only in the luminal fluid of the epididymal region which secreted it. Using an *in vitro/in vivo* microperfusion technique [2] and immunogold electron microscopy labelling, we demonstrated that the epithelium which secreted it, specifically reabsorbed the protein from the lumen of the tubule. Thus, the presence of train A protein in the epididymal fluid was the result of steady state between secretion and absorption. The transcription and translation of Train A mRNA were simultaneous and actively regulated by testicular factors. The function of this protein is unknown, it does not seem to interact directly with sperm and its biological activity might even be expressed after its cellular reabsorption. Train A might therefore participate in an unknown function in the epithelial cells of this first part of the epididymis by an autocrine pathway.

[1] Castella S. et al. (2004) *Biol Reprod* **70**, :319-28.

[2] Castella S. et al (2004). *Biol Reprod.* **71**,1677-87.

Chemokine-glycosaminoglycan interactions participate to the endothelium organospecificity and cellular addressing

Crola Da Silva C., Lamerant-Fayel N. and Kieda, C.

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS affiliated to Orléans University and INSERM, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

Supporting the chemotaxis and the transendothelial migration of leukocytes, chemokines and their receptors play a vital role in the organo-specific recognition between endothelial cells (ECs) and leucocytes. Interestingly, apart of their receptors, chemokines also interact with glycosaminoglycans (GAGs) on cell surfaces. This binding increases their effective local concentration creating a chemoattractant gradient and favors their presentation to the cell surface receptors.

From various human endothelial cell lines established in our laboratory, we have demonstrated specific activities of given chemokines towards given EC lines, as illustrated by the lymphocyte adhesion increase on 6CKine stimulated-peripheral lymph nodes ECs.

Our aim is to understand the molecular mechanisms by which chemokines participate to the endothelium organospecificity.

Using flow cytometry and fluorescence microscopy, we have investigated the chemokine receptors expression and chemokines presentation on EC lines from various organs. GAGs distribution on endothelial cell surface was also studied.

The chemokine receptors expression level did not correlate with the binding efficiency of their respective chemokines. Moreover, microscopy studies have clearly shown the 6CKine binding on the extracellular matrix (ECM), suggesting the implication of GAGs. In order to identify the GAG types involved in chemokine presentation, antibodies against GAGs were used to characterize the ECM composition. Heparan sulfate and chondroitin sulfate were detected on all EC lines with various expression levels according to the EC line origin.

A detailed understanding of chemokine-GAG interactions may be a potentially useful therapeutic approach, especially in inflammation. To better characterize the specificity of these interactions, surface plasmon resonance experiments are being performed.

Dr. Claudine Kieda

kieda@cnrs-orleans.fr

Tel/Fax : 00-33(0)2-38-25-55-61

HUMAN EPIDIDYMAL SECRETOME AND PROTEOME

JL. Dacheux⁽¹⁾, M. Belghazi⁽²⁾, Y. Lanson⁽³⁾, F. Dacheux⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours, 37380 Nouzilly, France, ⁽²⁾Service de Spectrométrie de Masse pour la Protéomique, INRA, 37380 Nouzilly, ⁽³⁾ Service Urologie CHUR, 37000 Tours

In all mammals the final stages of sperm differentiation occur outside the gonad and are not under the genomic control of germ cells. Testicular spermatozoa develop the ability to fertilize an ovum only when they transit the epididymis. In this organ, several successive differentiations occur to the gametes, particularly in their plasma membrane proteins. These sperm modifications occur always in the epididymal environment which regulated continuously, particularly in protein composition. Synchrony between changes in sperm and the epididymal milieu indicate that they are associated.

We present an analysis of the sequential changes in the protein composition of the epididymal luminal fluid and in the synthetic activity of the human epididymal epithelium. The secreted proteins were determined by incubating tubules in vitro and the luminal proteins were determined using luminal fluid collected by flushing lengths of tubules, and the preparations were analysed by two dimensional gel electrophoresis and nano LC MS/MS. In most species, epididymal activity is highly regionalized both in the secretory activity of the epithelium and the protein composition of the luminal fluid. However, in humans, this regionalization is present, but the number of sequential changes along the epididymis is reduced.

In conclusion, in all the species studied, the protein composition of the luminal fluid changed significantly according to the region of the epididymis. However in humans, there were only minor changes in the major proteins secreted. It is suggested that specificity of protein secretion could be related to the difference between species in the location in the epididymis where the sperm become fertile.

Épigénétique ou comment les cellules se souviennent.

Martine Decoville. Centre de Biophysique moléculaire, CNRS UPR 4301, conventionnée avec l'Université d'Orléans, rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France.

decovil@cnsr-orleans.fr

Le terme épigénétique a été introduit par Waddington en 1942 comme l'étude des processus par lesquels le génotype d'un individu est utilisé pour aboutir à son phénotype. En effet il est clair que la connaissance du génotype d'un individu ne suffit pas pour prédire son phénotype. En 1994, Robin Holliday revoit cette définition et introduit la notion d'hérédité épigénétique, impliquant que des changements dans la fonction du génome peuvent se transmettre à travers les divisions cellulaires et même d'une génération à l'autre. Le mot épigénétique désignera en fait les processus d'hérédité nucléaire qui ne sont pas fondés sur des différences dans la séquence d'ADN. Ces processus épigénétiques correspondent à des changements de la configuration de la chromatine, modulant ainsi l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. Parmi ces processus on retrouve la méthylation de l'ADN, la modification des histones ou d'autres composants de la chromatine, l'intervention de petits ARN non codant.

La drosophile constitue un excellent modèle pour l'étude des mécanismes épigénétiques. En effet au cours du développement embryonnaire, les gènes *Hox* sont activés selon des profils particuliers qui perdurent tout au long du développement même lorsque les activateurs ont disparu. Deux groupes de gènes ont été identifiés comme responsable du maintien de l'expression des gènes *Hox* : les gènes du groupe *Polycomb* (*Pc-G*) qui maintiennent les gènes *Hox* réprimés et les gènes du groupe *trithorax* (*trx-G*) qui au contraire les maintiennent activés. Les produits de ces gènes agissent sous forme de plusieurs complexes multiprotéiques s'associant à la chromatine qui pourraient affecter directement sa structure en induisant par exemple la désacétylation des histones. Ces complexes se forment au niveau des gènes cibles sur des régions particulières appelées PRE et TRE. Les complexes répresseurs PC-G empêcheraient le remodelage de la chromatine par les complexes activateurs TRX-G. De cette façon, les produits de ces deux groupes de gènes assureraient au cours du développement le maintien des programmes cellulaires. On connaît actuellement chez la drosophile plus d'une dizaine de protéines PC ou TRX, ainsi que 4 complexes multiprotéiques, deux complexes PC-G : PRC1 et PRC2, et deux complexes TRX-G : TAC1 et BRM.

Un problème majeur concerne la reconnaissance des régions PRE ou TRE. En effet d'une part la comparaison des séquences de différents PRE ou TRE ne permet pas de dégager clairement une séquence consensus, d'autre part la plupart des protéines PC-G ou TRX-G ne montrent pas de spécificité de séquence. Comment alors les complexes PC-G ou Trx-G sont-ils recrutés sur leurs cibles ? Nous avons montré que la protéine DSP1 (Dorsal Switch Protein) participe au recrutement de protéines du groupe Polycomb au niveau des PRE. La protéine DSP1 appartient à la famille HMGB1. L'analyse d'un mutant nul montre qu'en fonction du locus étudié elle se comporte comme une protéine PC-G ou TRX-G, et qu'elle participe au remodelage local de la chromatine. Par des études génétiques et biochimiques, nous avons montré que DSP1 peut se lier *in vivo* à la séquence 5'-GAAAA-3' et permettre ainsi le recrutement de la protéine du groupe PC : PHO au niveau d'un PRE.

M. Decoville, E. Giacomello, M. Leng, and D. Locker. (2001) DSP1, an HMG-like Protein, Is Involved in the Regulation of Homeotic Genes. *Genetics* 157, 237-244.

Rappailles, A., Decoville, M. and Locker, D. (2005) DSP1 is involved in expression of *Scr* gene. *Biology of the Cell* 97, 779-785.

Jérôme Déjardin, Aurélien Rappailles, Olivier Cuvier, Charlotte Grimaud, Martine Decoville, Daniel Locker and Giacomo Cavalli. (2005) Recruitment of Drosophila Polycomb Group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* 434, 533-538.

TOXICITE RADICALAIRE DE L'ETHANOL ET HEPATOPATHIES

Céline EICHWALD-GRONDEUX, Elodie RABUT, Dominique ERNOUF
 Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge, 37200 Tours
 Tél : 02-47-36-71-79 Mail : dominique.ernouf@univ-tours.fr

Le métabolisme oxydatif de l'éthanol s'accompagne de la production de radicaux libres à l'origine d'un stress oxydatif responsable d'une atteinte multiorganique, que l'alcoolisation soit aiguë ou chronique. **C'est l'atteinte hépatique qui est prédominante.**

Au niveau des hépatocytes, les dérivés actifs de l'oxygène (DAO) : peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , anion superoxyde $\cdot O_2^-$ et radical hydroxyle $HO\cdot$ sont formés.

- ✘ Dans la chaîne respiratoire mitochondriale, la production d' $\cdot O_2^-$ est potentialisée par l'oxydation de l'éthanol sous l'action de l'alcool déshydrogénase (ADH).
- ✘ Dans les microsomes et peroxysomes, lorsque l'éthylisme est chronique.

La voie du MEOS (Microsomal Ethanol Oxidizing System) implique le CYP2E1 inductible notamment par l'éthanol. L' O_2 est réduit par le CYP2E1 en DAO: H_2O_2 puis $HO\cdot$ et $\cdot O_2^-$ par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Des radicaux hydroxyéthyles $CH_3-C\cdot HOH$ sont également produits.

⇒ La production de DAO est surtout majorée lorsque l'alcoolisme est chronique.

Conséquences au niveau cellulaire du stress oxydatif dû aux radicaux libres

- ✘ Lipoperoxydation des membranes, dont le rôle initiateur est attribué au fer, catalyseur de réactions radicalaires dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer,
- ✘ Oxydation des protéines, dont les enzymes,
- ✘ Déplétion en anti-oxydants,
- ✘ Altération de l'ADN mitochondrial,
- ✘ Formation d'adduits protéiques, impliqués dans la fibrogénèse hépatique et à l'origine de réponses allo- et auto-immunes,
- ✘ Déclenchement d'un processus inflammatoire,
- ✘ Augmentation de l'apoptose.

Le stress oxydatif est responsable de lésions du foie principalement (mais aussi de l'estomac et du système nerveux central). Cette toxicité radicalaire potentialise la toxicité classiquement imputée à l'éthanol et à l'acétaldéhyde formé lors du métabolisme oxydatif de celui-ci.

L'utilisation de chélateurs du fer, d'antioxydants (vitamines E, C, zinc), de S- adénosylméthionine et de polyénylphosphatidylcholine sont autant de perspectives de prise en charge envisageables pour prévenir (ou traiter) l'hépatopathie alcoolique. Ces traitements ne doivent cependant pas faire oublier que c'est l'arrêt de l'alcoolisation qui est à la base de toute thérapeutique.

Glycosylated Polyethylenimines for *in vivo* Gene Delivery in the Mouse Lung

Isabelle Fajac¹, Stéphanie Grosse¹, Guiti Thévenot¹, Mohamed Abdelkarim¹, **Monsigny, Michel**².

¹ *Physiol. Respir., CHU Cochin, Paris;* ² *Glycobiologie, CBM, CNRS, Orléans.*

Branched and linear polyethylenimines (PEI) of low molecular weight have been proved to be efficient vectors for *in vitro* and *in vivo* gene transfer into respiratory cells. Glycosylated PEIs were shown to enhance *in vitro* gene transfer by favoring the complex entry into the airway cells and by eliciting a lower cytotoxicity as compared to the unsubstituted polymer. The aim of our study was to evaluate the *in vivo* efficiency of gene transfer mediated by glycosylated PEIs in the mouse lung. Several glycosylated PEIs (25 kDa; branched form) were generated by substituting about 5% of their amino groups with either lactosylthiocarbamoyl, glucosylthiocarbamoyl or mannosylthiocarbamoyl units. The requested amount of glycosylated PEI or unsubstituted PEI (25kDa, branched form or 22 kDa, linear form, ExGen) was mixed with 50, 100 or 150 g of a plasmid encoding either luciferase or green fluorescent protein (GFP) in a final volume of 100 to 200 l of various formulation solutions in order to reach the requested N/P ratio. These complexes were instilled intranasally into briefly anesthetized five-week-old female BALB/c mice. At the time of the gene transfer analysis step, the animals were killed and the lungs and trachea were used to estimate the gene transfer efficiency. For all the vectors tested, no luciferase activity was observed in the trachea. In the lungs, for all 25 kDa PEI derivatives, the highest luciferase activity (around 104 RLU/mg proteins) was observed 48 hours after complex instillation and with complexes generated in a 5% glucose solution, with 100 g of plasmid in a final volume of 150 l. For each PEI derivative, the optimal N/P ratio was in the 10 to 15 range. A slightly higher luciferase activity was observed with complexes made with linear 22 kDa PEI (105 RLU/mg proteins) than with those made with 25 kDa branched PEI derivatives. However, the GFP expression was similar for all the vectors tested: few cells expressed GFP and they were more often observed in the lung than in the airway epithelium. Glycosylated PEIs were less toxic than unsubstituted 22 and 25 kDa PEIs which were the cause of the death of some mice. Complexes made with fluoresceinylated and lactosylated PEI were also instilled. They were found to be present in many pulmonary cells, indicating that the entry into those cells is probably not a limiting step. The identification of the type of respiratory cells which are most readily transfected and the study of the intracellular limiting steps *in vivo* are ongoing.

Supported by the Association Vaincre la Mucoviscidose and INSERM.

Production de pseudovirions du papillomavirus humain de type 31 par transfection de cellules de mammifère avec des gènes de synthèse dont les codons ont été optimisés

Maxime J.J. Fleury, Antoine Touzé et Pierre Coursaget.

INSERM U618, Equipe « Virus, Vectorisation de gènes et Imagerie Fonctionnelle ». Faculté des Sciences Pharmaceutiques "Philippe Maupas", 31 av. Monge, 37200 TOURS.

Les papillomavirus humains (HPV) sont des virus à ADN non enveloppés possédant une capsidie icosaédrique de 50 à 55 nm de diamètre composée d'une protéine majeure L1 (360 protéines par capsidie) et d'une protéine mineure L2 (12 à 36 protéines par capsidie). Lorsque les protéines de capsidies sont produites en cellules d'insecte à l'aide de baculovirus recombinants, elles s'auto-assemblent en pseudo-particules virales (Virus-like particles, VLP). Des pseudovirions peuvent être obtenus *in vitro* par interaction entre ces VLP et un plasmide. Ces pseudovirions ont la capacité de transférer cet ADN dans des cellules cibles ce qui en fait des vecteurs de gènes potentiels. Récemment, un nouveau procédé permettant une production de fortes concentrations de pseudovirions a été décrit pour l'HPV de type 16 (Buck *et al.*, J Virol 2004).

Le but de ce travail a été de produire par un procédé similaire, en cellules de mammifère, des pseudovirions de papillomavirus humains de type 31, contenant un gène d'intérêt (plasmide codant pour la luciférase). Dans un premier temps, les gènes de capsidies (L1 et L2) ont été optimisés pour la production en cellule de mammifère. L'usage des codons a été humanisé, les séquences de polyadénylations internes ont été retirées et des séquences kozak ont été ajoutées en amont des codons d'initiation. Les gènes synthétiques optimisés et les gènes sauvages ont été clonés dans les plasmides d'expression pIRES. La transfection de cellules 293 FT avec les gènes optimisés (L1h et L1h+L2h) et sauvages (L1wt et L1wt+L2wt) a permis de montrer qu'il y avait bien production des protéines L1 et L2 en cellules de mammifères et que l'optimisation des gènes conduit à une augmentation très importante de la production des protéines de capsidie. L'auto-assemblage des protéines de capsidies en VLP a été vérifiée par microscopie électronique. Afin de produire des pseudovirions, les cellules 293 FT ont été co-transfectées par les plasmides codant les gènes optimisés plus un plasmide de taille inférieure au génome viral codant pour la luciférase. La présence de VLP dans les fractions de densité 1.32 d'un gradient de chlorure de césium suggère la production de pseudovirions. La capacité de transfert de gènes de ces pseudovirions a été vérifiée en cellules COS7. Ces pseudovirions sont actuellement utilisés pour déterminer le pouvoir neutralisant d'anticorps monoclonaux et de sérum immuns.

Mots clés : Papillomavirus, optimisation de gène, VLP, pseudovirions, transfert de gène.

**Etude fonctionnelle comparative de la sous-unité ARN télomérase virale
basées sur des mutations « naturelles »**

Fragnet, L., Kut E. et Rasschaert D.

Laboratoire Télomérase, Lymphome Viro-Induit, Centre INRA de Tours, UPR086, 37380 NOUZILLY.

L'implication d'infections virales dans la genèse de certains cancers est maintenant largement documenté. En revanche, l'étroite corrélation entre les virus et l'activation de l'activité télomérase n'a été établie que très récemment. L'activité télomérase, détectée dans plus de 85% des cancers humains, participerait aux processus d'immortalisation, étape associée à la transformation cellulaire. Le complexe minimal actif de la télomérase est formé d'une sous-unité ARN (TR) comportant la séquence matricielle qui est rétro-transcrite au niveau des télomères cellulaires par une sous-unité protéique, TERT, possédant l'activité transcriptase inverse. Bien qu'une expression d'activité télomérase ait été observée suite à certaines infections virales, notamment par des herpesvirus, aucune composante virale ne semblait être associée directement à la télomérase. Aussi, nous avons identifié pour la première fois une sous-unité TR d'origine virale (vTR) dans le génome du virus de la maladie de Marek (MDV). Cet *alpha*-herpesvirus est responsable de l'apparition de lymphomes T chez le poulet, son hôte naturel. Actuellement, les 2 vaccins utilisés en France permettent une protection efficace contre la tumorigénèse viro-induite, mais n'entravent pas la multiplication viral, assurant ainsi la pérennité du virus dans les élevages avicoles. Du fait de la forte homologie de séquence (88%) entre les sous-unités virale vTR et aviaire, chTR, se traduisant par une grande conservation des domaines fonctionnels essentiels à l'activité télomérase, nous avons conduit une étude comparative de ces 2 composantes. Nous avons ainsi démontré que vTR est fonctionnel et serait 3 à 7 fois plus efficace que chTR lorsqu'il est associé respectivement aux sous-unité catalytique aviaire chTERT et murine mTERT. Aussi, par mutagenèse dirigée, nous avons établi que 3 mutations localisées dans le domaine en pseudonoeud de vTR étaient suffisantes pour diminuer l'efficacité de vTR au niveau de chTR. Plus précisément, ces divergences nucléotidiques pourraient renforcer et stabiliser la structure des hélices constituant le pseudonoeud de vTR, favorisant ainsi sa dimérisation et son interaction avec TERT. D'autre part, nous avons conduit une étude comparative similaire, basée sur l'observation de 3 mutations dans le gène vTR de la souche vaccinale non-oncogène MDV-Rispens, entraînant une perte d'efficacité de 50% du TR en cellules, par rapport au vTR de la souche oncogène MDV-RB1B. Nous avons déterminé par mutagenèse dirigée que cette différence d'activité serait due à la mutation ponctuelle apparue dans la séquence consensus de la boîte H, induisant un défaut d'accumulation et de ciblage du vTR MDV-Rispens dans le noyau des cellules. Ces résultats suggèrent donc que la sous-unité vTR pourrait être un facteur déterminant dans les processus de tumorigénèse viro-induite.

**IDENTIFICATION D'INHIBITEURS DE LA TRANSPOSASE DE L'ELEMENT
MARINER MOS-1.**

S. GERMON, C. TISSANDIER, Y. BIGOT^{a)}

M. DUBERNET, J. GUILLARD, M.C VIAUD-MASSUARD.^{b)}

^{a)} *Laboratoire d'Etude des Parasites Génétiques, Parc de Grandmont, Avenue Monge, 37200 Tours.*

^{b)} *EA 3857 SPOT Laboratoire de Chimie Organique, U.F.R des Sciences Pharmaceutiques, 31 Avenue Monge
37000 Tours.*

L'élément *Mariner Mos-1* est un transposon de classe II, qui se déplace dans le génome par un mécanisme d'excision-réinsertion. Ce transposon (1300 pb environ) est composé de deux répétitions terminales inversées (ITR) situées de part et d'autre d'un cadre ouvert de lecture codant la transposase, enzyme nécessaire et suffisante pour la transposition de *Mariner*. Afin de mieux étudier le mécanisme par lequel le transposon s'excise et se réinsère et, pour faciliter la production de transposases éventuellement cytotoxiques, nous avons cherché à identifier des inhibiteurs de transposase.

Nous avons regroupé une centaine de produits décrits comme ayant une activité inhibitrice sur l'intégrase d'HIV (transposase et intégrase ont des homologies de structure et de fonctionnement) ou, appartenant à nos chimiothèques. Nous avons ensuite réalisé un criblage de ces produits pour leur capacité à inhiber la transposition dans un test *in vitro*. Pour les plus prometteurs d'entre eux, nous avons également réalisé des tests de coupure ou de retard sur gel pour mieux identifier les étapes de la transposition affectées par l'inhibiteur. Parmi les différents composés, certains inhibent la transposition de façon totale et d'autres de façon partielle. Ces composés présentent une structure de type bis(hétéroarylmaléimide) (Figure 1).¹

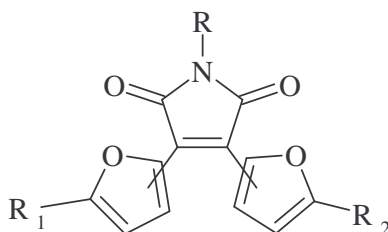


Figure 1

Des études complémentaires sont en cours et plus précisément sur l'étude du mécanisme d'inhibition de ces composés. Leur effet *in vivo* en bactéries sera également déterminé.

1. M. Dubernet, V. Caubert, J. Guillard, M.-C. Viaud-Massuard, *Tetrahedron* 2005, 61/19, 4585.

**Multiple roles for beta-arrestins in FSH signalling :
a 5 Ser/Thr cluster in the C-terminus of the receptor is important
for beta-arrestin recruitment, desensitization and internalization
but not for beta-arrestin-mediated Erk activation.**

E. Kara, P. Crepieux, C. Gauthier, N. Martinat, V. Piketty, F. Guillou, E. Reiter
UMR INRA-CNRS-Univ. Tours-Haras Nationaux, PRC, Equipe " Mécanismes d'action des
Gonadotropines ", 37380 Nouzilly France

The follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) is a seven transmembrane spanning receptor that couples to G α s upon agonist stimulation. β -arrestins (β -arr) are rapidly recruited to the FSH-activated receptor and play key roles in the desensitization and internalization processes. β -arrestins are also able to stimulate the ERK pathway in response to some 7TMSR activation, through a G protein-independent mechanism. However, the role of β -arrestins in ERK activation by the FSH-R is still unknown.

We have identified a cluster of five Ser/Thr residues in the c-terminus of the FSH-R (T638, T640, S641, S642 and T644) which is important for β -arr recruitment. When these residues were mutated into Alanine (5A), FSH-induced recruitment of β -arr 1 and β -arr 2 was reduced by 90% as assessed by co-immunoprecipitation with the receptor. As expected, cAMP accumulation by the 5A mutant was enhanced with respect to wild-type receptor. Symetrically, the internalization of 5A mutant was reduced compared to the wild-type control. In striking contrast however, the ability of the 5A mutant to activate ERK via the β -arr pathway was actually increased compared to wild-type.

Together, these results suggest that at least two functionally distinct pools of β -arr are recruited to the activated FSH-R : 1) the predominant part (90%) interacts with the Ser638-Thr644 cluster, involved in both desensitization and internalization mechanisms and exerts a negative role on the ERK activation by both Gs and β -arr-dependent mechanisms, 2) a smaller proportion of the β -arr does not interact with the same Ser/Thr cluster and is required for ERK activation by the β -arr-dependent pathway.

GLYCOSYLATION DE LA GONADOTROPINE EQUINE (eLH/CG) ET DE SES SOUS-UNITES PRODUITES EN CELLULES D'INSECTES Sf9 ET MIMICTM

Sébastien Legardinier, Danièle Klett, Jean-Claude Poirier, Yves Combarous, Claire Cahoreau.

INRA/CNRS/Université de Tours UMR 6175, PRC, F-37380 NOUZILLY

Dans le but de produire un substitut à l'hormone chorionique équine naturelle (eCG), nous avons co-exprimé dans le système baculovirus-cellules d'insectes les deux ADN complémentaires codant les sous-unités α et β , identiques à ceux codant la LH équine (eLH). La production de la eLH/CG recombinante et de ses sous-unités a été réalisée par (co)infection des cellules Sf9 ou MimicTM avec les baculovirus simple recombinant α et β . Les cellules MimicTM sont des analogues transgéniques des cellules Sf9 exprimant de manière stable les glycosyltransférases nécessaires à l'élaboration de chaînes N-oligosaccharidiques sialylées de type complexe (1). Bien que possédant la double activité LH et FSH *in vitro*, les hormones hétérodimériques recombinantes issues des cellules Sf9 et MimicTM ne sont pas actives *in vivo* (2). La glycosylation, en particulier la sialylation, joue un rôle crucial dans la demi-vie de l'hormone (3). Les chaînes saccharidiques de la eLH/CG et de ses sous-unités ainsi produites ont été analysées au moyen de lectines spécifiques par Western Blot (WB) et Lectine-ELISA.

Les glycoprotéines natives et non purifiées (ELISA) ou dénaturées et purifiées (WB) sont détectées et identifiables avec les mêmes lectines. Bien que les cellules MimicTM permettent d'élaborer des N-glycannes de type complexe mammalien, la sialylation n'a pas lieu malgré la présence des gènes des sialyltransférases (ST6, ST3). Les O-glycannes élaborés par les lignées Sf9 et MimicTM sont de type Gal- β 1-3GalNAc également non sialylé (ST3). (4)

1Hollister *et al.* (2002) **Biochemistry** 41 :15093-104.

2Legardinier *et al.* (2005) **J Mol Endocrinol** 34 (8) :47-60

3Klett *et al.* (2003) **Reprod Biol Endocrinol** 1 :64-72

4 Legardinier *et al.* (2005) **Glycobiology** 15 (8) :776-90

Évaluation biologique *in vitro* de nanoformulations superparamagnétiques pour la chimiothérapie des cancers

Émilie Munnier*; Simone Cohen-Jonathan; Claude Linassier ; Laurence Douziech-Eyrolles ;
Martin Soucé; Hervé Marchais; Lazare N’Gaboni Okassa ; Jean-François Fouquet ;
Pierre Dubois ; Igor Chourpa

Équipe Focalisation magnétique d’agents anticancéreux,

Laboratoire de chimie analytique, Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge 37 200 Tours

* emilie.munnier@etu-univ-tours.fr

Des nanoformulations superparamagnétiques constituées par l’association de ferrofluides et d’agents anticancéreux sont développées afin de vectoriser le médicament vers le tissu cible. Les oxydes de fer superparamagnétiques constituent le vecteur car ils permettent la rétention de la formulation au niveau de la tumeur au moyen d’un champ magnétique externe adapté. Cette approche permet d’optimiser l’action anti-tumorale des molécules usuelles en favorisant leur concentration sur le site d’action tout en diminuant leurs effets systémiques

Nous avons évalué le noyau actif de nanovecteurs préparés au laboratoire, composés de doxorubicine (DOX) associée ioniquement aux ferrofluides (FF-DOX).

L’étude est réalisée sur cellules MCF-7 cultivées à 37°C sous 5% CO₂; la viabilité est déterminée par le test au MTT. La cytotoxicité des FF-DOX sur la lignée MCF-7 a été comparée à celle de la DOX, pour différentes durées d'exposition.

L’imagerie confocale multispectrale a été appliquée pour suivre la fluorescence intrinsèque de la DOX accumulée par des cellules traitées. Il nous a été possible de détecter trois fluorescences différentes de la DOX intracellulaire: une forme nucléaire et deux formes cytoplasmiques. La répartition relative de ces formes a été cartographiée et quantifiée, ainsi que l’accumulation totale de la DOX. Nos résultats montrent qu’en comparaison avec la DOX, le traitement des cellules par FF-DOX inverse le rapport entre les deux fractions cytoplasmiques du principe actif. La division par 5 de la fluorescence intracellulaire accompagnée de la cytotoxicité préservée laisse suggérer une forme non fluorescente de DOX dans les cellules traitées par les nanoformulations.

PREPARATION ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES COMPOSITES SUPERPARAMAGNETIQUES

L. Ngaboni Okassa^{a,b}, H. Marchais^a, L. Douziech-Eyrolles^b,
S. Cohen-Jonathan^b, E. Munnier^b, M. Soucé^b, C. Linassier^c, P. Dubois^b, I. Chourpa^b

*Université François-Rabelais de Tours, Equipe «Focalisation magnétique d'agents anticancéreux»,
^aLaboratoire de Pharmacie Galénique, ^bLaboratoire de Chimie Analytique,
U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours
^cService d'oncologie médicale, CHU Bretonneau, Tours*

L'administration par voies intraveineuse et/ou intra-artérielle d'agents anticancéreux est limitée par la toxicité systémique (cardiaque, rénale, hépatique) de ce type de molécules. Le concept d'administration ciblée des anticancéreux par focalisation magnétique de vecteurs nanoparticulaires superparamagnétiques administrés par voie intraveineuse constitue une réponse possible à cette limite. Ce travail a pour objectif la mise au point de nanoparticules composites superpara-magnétiques à base d'oxydes de fer et d'un polymère biocompatible, le poly(acide lactique-co-acide glycolique) ou PLAGA.

Les oxydes de fer (magnétite et maghémite) sont obtenus par co-précipitation des sels ferreux et ferriques en milieu alcalin puis des molécules d'acide oléique sont adsorbées à leur surface afin d'améliorer leur incorporation dans la matrice polymère. Les nanoparticules composites superparamagnétiques sont obtenues par une technique de simple émulsion/évaporation de solvant (1).

Les nanoparticules composites apparaissent en MET de forme sphérique et ont un diamètre hydrodynamique moyen d'environ 280 nm. L'incorporation des oxydes de fer dans la matrice polymère est optimum pour un rapport massique oxydes de fer/PLAGA de 1:1. La présence d'oxydes de fer dans les nanoparticules composites est confirmée par FT-IR par la présence d'une bande caractéristique de la magnétite à 586 cm^{-1} . La variation du potentiel zêta en fonction du pH indique des propriétés de surface similaires pour les nanoparticules polymère et les nanoparticules composites préparées avec un rapport oxydes de fer/ PLAGA de 1:1 et de 1:2. Ce résultat est un élément en faveur de la présence des molécules d'oxydes de fer dans la matrice polymère et non à la surface des nanoparticules.

Les nanoparticules composites obtenues présentent donc des caractéristiques intéressantes en vue d'une application en thérapeutique. La formulation présentant le meilleur taux de charge en magnétite est retenue pour la préparation de nanoparticules composites superparamagnétiques chargées avec un agent anticancéreux.

(1) Ngaboni *et al.*, Int. J. Pharm., 302, 187-196 (2005)

Phylogenetic relationships between extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* of human and avian origin

Maryline Répérant¹, Sylvie Laurent¹, Denis Rasschaert¹, Catherine Schouler¹, Pierre Germon¹, Erick Denamur², Roland Quentin³, and Maryvonne Moulin-Schouleur¹

¹ INRA-Centre de Tours, UR86, 37380 Nouzilly, France – ² INSERM U722 et Université Paris 7, 75018 Paris – ³ UFR Médecine Tours, EA 3854, 37032 Tours cedex, France.

Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) are a common cause of extra-intestinal infections in humans such as urinary tract infections, septicaemia, neonatal sepsis and meningitis, but also in poultry where they are responsible for a systemic disease. Avian extra-intestinal pathogenic *E. coli* (called APEC strains) share various virulence factors with human ExPEC strains, and belong to the same serotypes (O2:K1, O18:K1, O78). Furthermore, previous phylogenetic studies have suggested clonal relationships between some avian and human ExPEC strains. All these data indicate a potential risk of zoonotic infection due to APEC strains that has to be assessed by additional comparisons between avian and human ExPEC strains.

In this study phylogenetic relationships of 103 *E. coli* strains mainly isolated from extra-intestinal infections: human (58), avian (39), and other animal (6) origins were analyzed. Assignment in the 4 main phylogenetic groups of *E. coli* population was done using the PCR method of Clermont *et al.* (2000), and a multilocus sequence typing (MLST) analysis was performed based on 6 loci (*adk*, *gcl*, *gdh*, *mdh*, *metA* and *ppk*), according to Adiri *et al.* (2003). Most of the APEC strains and of the ExPEC human strains belonged to the phylogenetic group B2, while 5 strains were of the phylogenetic D group. Interestingly, avian and human ExPEC strains of serogroup O78 mainly belonged to the phylogenetic group A. The phylogenetic tree reconstructed from the MLST results showed that APEC strains were closely related to ExPEC human strains isolated from neonatal sepsis and meningitis.

Our results show strong phylogenetic relationships between ExPEC strains from newborn meningitis and sepsis and APEC strains from colibacillosis of poultry that could indicate a potential zoonotic risk. The host-specificity of human and avian ExPEC strains has to be further investigated to evaluate such a risk.

Synthetic Glycocluster-Melan A Peptide Conjugates: Dendritic Cell Targeting for Cellular Vaccination

Oruganti Srinivas,¹ Pierre Larrieu,² Eric Duverger,¹ Annie-Claude Roche,¹

Michel Monsigny,¹ Francine Jotereau² and Jean-François Fonteneau²

¹ *Centre de Biophysique Moléculaire CNRS, UPR 4301, Orléans, France*

² *INSERM, Unité 601, Nantes, France*

The use of dendritic cells (DC) for the development of therapeutic vaccines for cancer is attractive¹ on account of their ability to present tumor antigenic epitopes *via* the MHC class I pathway. The presence of membrane lectins, DC-SIGN and ManR on dendritic cells which mediate sugar-specific endocytosis of mannose and fucose based di- and oligosaccharides² can be exploited for the uptake of tumor antigenic peptides and prompted us to design glycocluster-Melan A peptide conjugates to serve as high-affinity ligands putatively suitable for cellular vaccination. Using unique and non-trivial chemistry involving unprotected oligosaccharides, these conjugates were obtained by the coupling of Man α -6Man, Lewis^a/Lewis^x and lactose based glycosynthons³ to the Melan A peptide (30 amino acid long peptide containing the modified Melan A/Mart-1 epitope ELAGIGILTV) bearing an oligolysine stretch at the C-terminal end. These conjugates were evaluated for their uptake by DC based on DC-SIGN/ManR receptor mediated endocytosis and subsequently for the cross-presentation of the Melan A epitope *via* the MHC class I pathway to elicit a CD 8⁺ T-lymphocyte response.⁴ Interestingly, the dendritic cells incubated with Man α -6Man and Lewis^a/Lewis^x – Melan A conjugates could efficiently stimulate specific cytolytic T-lymphocyte clones and T cells derived from peripheral blood mononuclear cells. In contrast, DC incubated with lactose-based conjugate which is not recognized by DC lectins were ineffective. The details of synthesis and results from DC cross-presentation studies will be presented.

Acknowledgements: This work is supported by grants from Cancéropole Grand Ouest and la Ligue Nationale contre le Cancer. OS thanks la Ligue Nationale contre le Cancer for post-doctoral fellowship.

(1) Banchereau, J.; Steinman, R.M. *Nature*. **1998**, 392, 245-252.

(2) Frison, N.; Taylor, M.E.; Soilleux, E.; Bousser, M.T.; Mayer, R.; Monsigny, M.; Drickamer, K.; Roche, A-C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 23922-23929.

(3) Quéward, C.; Bourgerie, S.; Normand-Sdiqui, N.; Mayer, R.; Strecker, G.; Midoux, P.; Roche, A-C.; Monsigny, M. *Bioconj. Chem.* **1998**, 9, 268-276.

(4) Fonteneau, J-F.; Larsson, M.; Somersan, S.; Sanders, C.; Münz, C.; Kwok, W. W.; Bhardwaj, N.; Jotereau, F. *J. Immunol. Methods* **2001**, 258, 111-126.

Digestion enzymatique sur billes paramagnétiques avant analyse par spectrométrie de masse.

Sylvia Tigrett, Michel Canton et Karine Pacaud-Mercier

Agro-Bio, rue Denis Papin, La Chavannerie, 45240 La Ferté Saint Aubin

Récemment, la spectrométrie de masse a permis l'analyse de mélanges de peptides et de protéines. Après purification d'un mélange protéique, la ou les protéines résultantes peuvent être identifiées, soit par digestion in-gel après séparation de ces protéines, soit par digestion enzymatique de la fraction purifiée. La digestion enzymatique en solution, suivie de l'analyse MALDI-TOF des peptides, présente plusieurs inconvénients : la présence de pics d'auto-digestion de la trypsine, la détermination de la cinétique de digestion, les quantités de protéines, etc... L'utilisation d'un réactif de digestion immobilisé sur support paramagnétique permet de réduire considérablement le temps de mise au point et donc les quantités de matériels. Ce réactif paramagnétique apporte également un contrôle précis de la cinétique de la digestion, puisque la réaction est arrêtée par simple aimantation du tube, sans ajout d'aucun produit chimique.

L'efficacité du réactif de digestion a été mesurée sur différentes protéines. Les analyses MALDI-TOF des peptides résultants des digestions en solution ont été comparées à celles obtenues avec une digestion in-gel. De façon remarquable, le réactif de digestion paramagnétique a montré un meilleur recouvrement de séquence et un nombre de peptides supplémentaire. De plus, aucun pic d'auto-digestion du réactif n'a été détecté après une incubation de 15h00.

Le réactif de digestion présenté ici permet donc d'améliorer significativement la qualité d'une digestion en solution. Sa grande simplicité d'utilisation garantit un contrôle précis de la cinétique de digestion et une absence d'auto-digestion, tout en réduisant considérablement les temps de manipulations par rapport à une digestion classique in-gel.

Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to *Listeria* Infection

David TORRES, Laure JANOT, Valerie J.F. QUESNIAUX, Sergei GRIVENNIKOV[#], Isabelle MAILLET, Jonathon D. SEDGWICK[†], Bernhard RYFFEL¹ and Francois ERARD

Tumor necrosis factor (TNF) plays a critical role in the host response to the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* (LM). TNF exists in soluble and membrane-bound forms and exhibits both unique and overlapping activities. We examined the role of membrane TNF in the absence of secreted TNF for host resistance in knockin mice in which the endogenous TNF was replaced by a regulated, noncleavable allele (mem-TNF). Macrophages expressing mem-TNF produced nitric oxide and displayed normal bactericidal activity. Although mice completely deficient in TNF (TNF ^{-/-}) succumbed to LM infection within 4 days, mem-TNF mice controlled LM infection at a low dose (10⁴ CFU) but succumbed at a higher dose of infection (10⁵ CFU). In contrast to complete TNF deficiency, mem-TNF mice developed confined microabscesses that expressed inducible nitric oxide synthase. The transfer of lymphocytes from immunized mem-TNF, but not TNF ^{-/-}, mice protected TNF ^{-/-} mice from fatal infection. Taken together the data suggest that in the absence of soluble TNF, the presence of membrane-expressed TNF on phagocytes and lymphocytes partially restores host defense to LM infection.

Expression et rôle de l'AMPK protein Kinase (AMPK) dans les cellules de la granulosa issues de différents types de follicules pré-ovulatoires chez la poule

L. Tosca¹, S. Crochet¹, P. Ferré², F. Foufelle², S. Tesseraud¹ et J. Dupont¹

¹ INRA, UMR 6073 INRA / CNRS / Université Rabelais de Tours, 37380 Nouzilly, France

² Unité INSERM U 465, Centre Biomédical des Cordeliers, 75270 Paris, France

L'AMPK (kinase activée par l'AMP) phosphoryle et inactive deux enzymes clés du métabolisme lipidique dont l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC). Elle a été caractérisée dans l'ovaire de rate (*Tosca al*, 2005) mais pas encore dans l'espèce aviaire. L'ovaire de poule présente des follicules pré-ovulatoires riches en cholestérol. Ils sont classés selon leur taille (F1 pour le plus large) et présentent une stéroïdogénèse différente. Notre objectif a été d'étudier les effets de l'AICAR, un activateur connu de l'AMPK, sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa issues des follicules F1, F2 et F3/4.

Caractérisation : Le messenger et la protéine des sous-unités α_1 et α_2 (catalytiques) et β_1 et β_2 (régulatrices) de l'AMPK sont exprimés dans les cellules de la granulosa et de la thèque dans chaque follicule.

Etude : Les cellules de la granulosa ont été cultivées et soumises à différents traitements : **1)** en basal : différentes doses d'AICAR (0, 0.25, 0.5 et 1mM, 36h) ou AICAR 1mM de 0-1h pour voir l'activation de l'AMPK et de l'ACC, une de ses cibles **2)** en stimulé : AICAR 1mM \pm FSH 10^{-8} M ou IGF-1 10^{-8} M, 36h pour analyser la production de progestérone (P4) et l'expression des molécules impliquées dans cette sécrétion (3 β -HSD, p450scc et StAR). Dans les cellules de la granulosa de chaque follicule, l'AICAR augmente la phosphorylation basale de l'AMPK (en Thr172) et celle de l'ACC (en Ser79), de manière temps et dose-dépendante. En réponse à la FSH, l'AICAR (1mM, 36h) diminue la sécrétion de P4 et l'expression de la protéine StAR dans les follicules F1, et les augmente dans les follicules F2 et F3/4. En réponse à l'IGF-1, l'AICAR (1mM, 36h) augmente la sécrétion de P4 et l'expression de la protéine StAR dans les follicules F1 et F2, et les diminue dans les follicules F3/4. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un adénovirus dominant négatif spécifique de l'AMPK α_1 .

Chez la poule, L'AMPK est donc présente et activable *in vitro* par l'AICAR dans les cellules de la granulosa des follicules F1, F2 et F3/4. Dans ces cellules, l'AICAR via l'AMPK induit une augmentation ou une inhibition de la sécrétion de P4 en fonction du type folliculaire et du stimulus (FSH ou IGF-1) considérés. Ces effets s'expliquent tous par une action de l'AMPK sur la protéine StAR. Il reste maintenant à déterminer quelle est la voie de signalisation impliquée.

Effets de la Metformine sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa chez la rate : implication de l'AMP-activated protein Kinase (AMPK) ?

L. Tosca, P. Solnais et J. Dupont

INRA, UMR 6073 INRA / CNRS / Université Rabelais de Tours, 37380 Nouzilly, France

La Metformine (Metf) est un glucophage utilisé pour traiter le diabète de type 2 et certaines femmes infertiles atteintes du syndrome des ovaires polykystiques. Chez ces patientes, son effet bénéfique sur l'homéostasie métabolique améliore l'ovulation, la régularisation des cycles et le nombre de grossesses. Cependant, son action directe sur l'ovaire n'a pas été clairement établie. Nous avons donc évalué ses effets sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa de rate.

Des cultures primaires de ces cellules ont été soumises **1**) en basal à différentes doses de Metf (0, 0.5, 1, 5 et 10mM, 48h) puis à différents temps de Metf 10mM (0, 3, 6, 12, 24 et 48h) **2**) en stimulé à de la Metf 10mM \pm FSH 10^{-8} M, 48h. Ont ensuite été évaluées **a**) la production de P4 et E2 (dosage RIA) **b**) l'expression des molécules impliquées dans ces sécrétions (3 β -HSD, p450scc, p450-arom et StAR) **c**) l'expression de l'AMPK, cible connue de la Metf régulant le métabolisme énergétique **d**) les voies de signalisation MAPK ERK1/2, p38 et PI3K/Akt.

La Metf inhibe la production basale de P4 et de E2 de manière dose-dépendante. En réponse à la FSH, la Metf (10 mM, 48h) réduit de 10 fois la sécrétion de P4 et de 2 fois celle de E2. En présence de FSH, la Metf induit une baisse des protéines 3 β -HSD (et ARNm), p450scc, p450-arom et StAR. Par ailleurs, les phosphorylations de l'AMPK en thr172 et de ERK1/2, signalisation impliquée dans la stéroïdogénèse de ces cellules (*Tosca et al*, 2005), présentent une évolution biphasique. En effet, entre 0-6h, la phosphorylation de l'AMPK est augmentée et celle de ERK1/2 diminuée. L'inverse se produit entre 6 et 48h. Elles sont donc négativement corrélées. L'activation de l'AMPK à court terme et l'inhibition consécutive de ERK1/2 pourraient alors expliquer les effets biologiques à plus long terme de la Metf sur l'expression des molécules de la stéroïdogénèse, ceci aboutissant à une baisse de la sécrétion de P4 et de E2.

Dans les cellules de la granulosa de rate, la Metf inhibe la sécrétion de P4 et de E2 via une altération des acteurs de la stéroïdogénèse (3 β -HSD, p450scc, StAR et p450-arom). Comme dans d'autres types cellulaires, les effets de la Metf pourraient être expliqués par une activation de l'AMPK, qui dans nos cellules, inhibe la voie des MAPK ERK1/2. Ces résultats seront confirmés par l'infection des cellules par un adénovirus dominant négatif de l'AMPK α_1 .

SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS CHEZ LA BETTERAVE SUCRIERE : ROLE DE L'EPIGENETIQUE.

Gentil Marie-Véronique, Delaunay Alain¹, Joseph Claude¹, Hagège Daniel¹, Barnes Steve², Lefebvre Marc², Maury Stéphane¹.

¹- Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, UFR Sciences, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans Tel / Fax : 02 38 41 70 22. stephane.maury@univ-orleans.fr.

²- SES-Vanderhave-EUROPE, 3300 Tienen, Industriepark, Soldatenplein Z2 nr.15 Belgique.

La betterave sucrière est une plante bisannuelle d'intérêt industriel qui accumule du saccharose dans sa racine. La France est le premier producteur mondial de sucre de betterave sucrière. La région Centre possède les meilleurs rendements à l'hectare de France et 45000 ha exploités par 5 sucreries. Sa floraison n'est possible qu'après une période de froid hivernal appelée "vernalisation" qui entraîne l'utilisation des réserves. Ainsi, cette plante est cultivée de mars à novembre avant qu'il n'y ait vernalisation. Dans certains cas, des froids printaniers suffisent pour induire la floraison, ce qui explique que le caractère "résistance" à la vernalisation soit recherché par les semenciers. Des études sur la plante modèle *Arabidopsis* montrent que la vernalisation est sous contrôle épigénétique par le biais de mécanismes tels que la méthylation de l'ADN. Ainsi, une déméthylation progressive de l'ADN est observée au cours de la vernalisation, mais les loci cibles de cette déméthylation sont encore mal connus.

Notre équipe, en collaboration avec la société semencière SES-Vanderhave, s'intéresse à la vernalisation chez plusieurs génotypes de betterave sucrière. Le but est de trouver des marqueurs permettant la mise au point d'un test de sélection variétale. Actuellement, aucune étude du contrôle épigénétique de la vernalisation, ni aucun test de sélection ne sont disponibles sur cette plante. Notre équipe a mis en évidence l'existence d'une corrélation entre le taux de méthylation de l'ADN et la sensibilité génotypique à la vernalisation chez la betterave sucrière. Ces résultats encouragent la recherche des loci cibles de ce contrôle épigénétique par la technique de "Restriction Landmark Genome Scanning". Cette technique permet d'étudier l'état de méthylation de plus de 1000 îlots CpG en une seule expérience, sans aucune connaissance préalable des séquences. Une séparation bidimensionnelle par électrophorèse de fragments d'ADN radiomarqués est effectuée. L'ADN contenu dans les spots peut être récupéré. Après une étape de ligation d'adaptateurs, deux PCR successives sont réalisées dans le but d'amplifier les fragments de restrictions au dépend de fragments contaminants potentiels. Le clonage des produits PCR est réalisé à l'aide du kit TOPO TA Cloning puis transféré dans des cultures d'*E. coli*. Les fragments clonés sont ensuite séquencés puis comparés avec les banques de données. La RLGS a tout d'abord été mise au point à partir de cultures cellulaires de betterave sucrière et a permis d'identifier une dizaine de séquences, potentiels marqueurs de la morphogénèse. Cette technique est maintenant en cours d'application afin de trouver des loci cibles de la vernalisation chez la betterave sucrière.

Does transferrin or transferrin derivatives participate to phagocytosis in Sertoli cells?

Yefimova M.G.^{1,2}, Fontaine I¹, Guillou F¹.

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques, INRA/CNRS URA 1291, Nouzilly, France. ² From the Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Sertoli cells from mammalian testis seminiferous tubules are the supportive and nutritive epithelial cells providing normal development and maturation of spermatogenic cells. Mature Sertoli cells exhibit phagocytic activity toward their natural substrates – residual bodies and defective spermatogenic cells. As previously reported (Sakamoto H et al., 1997) two transferrin derivatives – transferrin dimer and transferrin tetramer - could facilitate phagocytosis in blood neutrophils and monocytes via Fc receptors. Since Sertoli cells synthesize and secrete transferrin we have evaluated if transferrin is involved in Sertoli cells phagocytic activity.

Purpose Our aim was to study if transferrin and its derivative (transferrin dimer) might contribute to residual body phagocytosis in Sertoli cells.

Methods Ex vivo phagocytosis assay in Sertoli cell culture from 20-old Wistar rat testis using FITC- and biotin-labeled residual bodies, which allows to separate bound and ingested residual bodies. Western-blot analysis of transferrin and its derivatives secreted by Sertoli cells culture in the presence and absence of phagocytosis substrate.

Results Preliminary data suggest the secretion of transferrin derivatives by Sertoli cells during residual bodies phagocytosis. Studies on the phagocytosis rate of Sertoli cells in the presence of transferrin and its derivatives are in progress.

CONFERENCES

C1 - Signalisation FSH au cours du développement post-natal des cellules de Sertoli. <i>Pascale Crépieux.....</i>	36
C2 - Protéomique et cancer du sein <i>Hubert Hondemarck.....</i>	37
C3 - L'épissage alternatif : de la diversité protéique à la diversité pathologique <i>Philippe Jeanteur.....</i>	38
C4 - Approches moléculaires, biochimiques et physiologiques de la productivité végétale. <i>Rémi Lemoine.....</i>	39
C5 - Puces pour l'analyse multiplexée en temps réel des interactions entre composants biologiques : nouvelles approches et apport des nanotechnologies. <i>Denis Pompon.....</i>	40
C6 - Le TFPI-2, un gène suppresseur de tumeur <i>Pascale Reverdiau</i>	41
C7 - Chimio prévention et alimentation : le couple Glucosinolate / Myrosinase chez les Crucifères <i>Arnaud Tatibouet.....</i>	42

Signalisation FSH au cours du développement post-natal des cellules de Sertoli.

Pascale Crépieux

Laboratoire de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA/ CNRS/
Univ. Tours/ Haras Nationaux/ IFR135, Centre de Recherches de Tours, 37380 Nouzilly France

L'hormone folliculo-stimulante (FSH) est une hormone hypophysaire qui cible les cellules somatiques des gonades mâles et femelles. Elle intervient de façon déterminante dans la gamétogenèse, comme le démontrent les expériences de transgénèse chez la souris, ou l'observation de mutations naturelles chez l'homme. Elle exerce sa fonction gamétogène en s'associant à un récepteur à 7 domaines transmembranaires, le R-FSH, exprimé à la surface des cellules de la granulosa du follicule ovarien et des cellules de Sertoli des tubes séminifères.

Chez le mâle, les cellules de Sertoli sont essentielles à la mise en place de la spermatogenèse à la puberté et à son maintien tout au long de la vie, parce qu'elles fournissent le support physique et métabolique permettant la production continue de gamètes. En modulant l'expression de plus d'une centaine de protéines différentes dans ces cellules, la FSH participe au contrôle de leur prolifération et de leur différenciation, ce qui contribue indirectement à leur potentiel gamétogène. La nature des gènes-cibles de la FSH varie donc en fonction du stade de développement.

Il apparaît aujourd'hui clairement que les mécanismes de signalisation FSH-dépendants sont régulés au cours du développement. Ainsi, nous avons montré une relation inverse entre le niveau d'activation des MAP kinases ERK dans les cellules de Sertoli et la réponse mitogène à la FSH de ces cellules. De plus, nous proposons également que la FSH régule ses gènes-cibles non seulement au niveau de leur expression transcriptionnelle, mais aussi au niveau de leur traduction, en modulant l'activité de la p70 S6 kinase selon un mécanisme inédit. Ces différentes données seront discutées.

PROTEOMIQUE ET CANCER DU SEIN

Hubert Hondermarck,

ERI-8 Inserm, Université des Sciences et Technologies de Lille.

De l'analyse différentielle aux approches fonctionnelles, la protéomique offre de nouvelles voies pour l'exploration des pathologies avec comme retombées la mise en évidence de nouveaux marqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, la complexité des systèmes biologiques et des régulations moléculaires reste la principale limitation des approches protéomiques et plus généralement post-génomiques. Ceci sera illustré avec le cas du cancer du sein.

Références :

- Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Lemoine J, Hondermarck H. The antiapoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kappaB activation induced via interaction between Akt and I kappaB kinase-beta in breast cancer cells. *Oncogene* 2005 24:5482.
- Proteomics: Biomedical and Pharmaceutical Applications. H. Hondermarck (ed.), 2004, *Kluwer-Springer*. ISBN 1-4020-2322-7.
- Hondermarck H. Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Molecular and Cellular Proteomics* 2003, 2: 281-91.

L'épissage alternatif : de la diversité protéique à la diversité pathologique

Philippe Jeanteur

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier II.

L'épissage des gènes est un passage quasi-obligé de l'expression génique chez les eucaryotes supérieurs. De plus, pour les trois quarts des gènes de mammifères, il existe des possibilités alternatives, parfois nombreuses, d'épissage de chaque transcrit primaire, ce qui rend compte au moins d'une grande partie de l'écart entre le nombre de gènes (environ 30.000) et celui des protéines qui est environ dix fois supérieur.

L'épissage alternatif est donc un niveau essentiel de la régulation qualitative de l'expression des gènes puisqu'il permet à une même séquence d'ADN de produire des protéines différentes selon le tissu ou les conditions d'environnement. Mais en contre-partie de son rôle créateur de diversité protéique physiologique, l'épissage alternatif est aussi une occasion de générer des transcrits aberrants aux conséquences pathologiques très variées.

L'exposé évoquera également le rôle de certains facteurs protéiques (protéines SR) dans l'épissage alternatif et leur possible utilisation comme cible thérapeutique pour des molécules chimiques.

Approches moléculaires, biochimiques et physiologiques de la productivité végétale.

Rémi Lemoine, UMR CNRS 6161, « Transport des Assimilats », Bâtiment Botanique, 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022 POITIERS Cedex.

Remi.Lemoine@univ-poitiers.fr

Les plantes supérieures sont des organismes multicellulaires capables d'effectuer la réduction du carbone atmosphérique par photosynthèse et de produire les sucres qui serviront de base à l'alimentation animale et humaine. Les plantes possèdent des organes spécialisés dans la production des sucres (les organes photosynthétiques) et d'autres qui, au contraire, vont utiliser (jeunes organes, fleurs) ou stocker les sucres ou des molécules dérivées (fruits, graines, tubercules). Les échanges entre les organes s'effectuent par l'intermédiaire d'un tissu particulier, le phloème qui constitue une partie du système vasculaire des plantes. Les mouvements de cellule à cellule nécessitent le passage à travers les membranes plasmiques : ce passage s'effectue grâce à des transporteurs spécialisés. L'activité de ces transporteurs va donc réguler les flux de sucres entre les différents organes et influencer directement sur la productivité de la plante.

Au laboratoire, nous avons entrepris les caractérisations biochimique puis moléculaire de différentes familles de transporteurs de sucres (saccharose, hexose, polyols). Les recherches se sont focalisées sur certains modèles végétaux (accumulation des sucres dans la baie de raisin, résistance au stress salin chez le céleri, transport des sucres dans la pomme de terre). Il est ainsi possible de cartographier la localisation de ces transporteurs dans la plante (à l'aide d'anticorps spécifiques) et d'étudier leur niveau d'expression au cours de différentes situations physiologiques (maturation de la baie de raisin, résistance à un stress abiotique) par des techniques de microarray et de Q-RT-PCR. Un certain nombre de transporteurs ont ainsi pu être identifiés et, dans certains cas, leur expression dans la plante a été modifiée par transgénèse afin de valider leur implication dans les phénomènes étudiés. En parallèle, nous avons pu mettre en évidence une régulation par les sucres de certains de ces transporteurs, ce qui ouvre de larges perspectives de recherche.

Bibliographie succincte.

- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S. 2003. Sugar-regulated expression of a putative hexose transporter gene in Grape. *Plant Physiol.* **131**, 326-334.
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and ABA signaling. *Plant Cell* **15**, 2165-2180.
- Lemoine R., Kühn C., Thiele N., Delrot S., Frommer W.B., 1996. Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant, Cell & Env*, **19**, 1124-1131.
- Leterrier M, Atanassova R, Laquitaine L, Gaillard C, Coutos-Thévenot P, Delrot S. 2003. Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *J. Exp. Bot.* **54**, 1193-1204.
- Noiraud N., Maurousset L., Lemoine R. (2001) Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* **13**, 695-705
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barriou F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Léon C, Renaudin JP, Dédaldéchamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S. 2005. Isogene specific oligoarrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, sous presse
- Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dédaldéchamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S. (2005) VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *J Exp Bot.* **56**, 1409-18.

Puces pour l'analyse multiplexée en temps réel des interactions entre composants biologiques : nouvelles approches et apport des nanotechnologies.

Denis POMPON. Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

La technologie des puces à ADN est l'approche de référence pour l'analyse des transcriptomes. Elle a tiré parti de la robustesse de la structure de l'ADN et de l'extrême efficacité des mécanismes de reconnaissance par appariement de base. Au contraire des acides nucléiques, les protéines sont des objets fragiles, se dénaturant facilement de manière souvent irréversible. Leur reconnaissance spécifique nécessite généralement d'autres protéines comme des anticorps. L'immobilisation des appâts sur le support des puces et le marquage des protéines « cible » restent techniquement délicats si l'on souhaite garder une efficacité élevée de reconnaissance et préserver le repliement, voir la fonction de ces objets.

Ces constatations ont conduit à deux approches complémentaires : d'une part l'utilisation de structures complexes multicouches au niveau des puces permettant d'optimiser la présentation des molécules appâts, d'autre part au développement de techniques de détection d'interaction ne nécessitant pas de marquage. En particulier, les structures auto organisées comme les membranes supportées permettent la création de structures biomimétiques assurant une reconnaissance efficace et un niveau très faible d'interaction non spécifique.

Elles sont de plus compatibles avec une détection sans marquage par résonance de plasmon de surface (SPR) qui a récemment franchi un saut de technologique avec le développement de solutions d'imagerie permettant à la fois une résolution spatiale élevée (quelques dizaine de microns) et un suivi en temps réel des interactions. L'intérêt de cette approche est encore fortement accru par l'association de ces technologies avec des techniques de micro structuration et de micro fluidique qui permettent d'envisager le suivi de plusieurs milliers d'interactions protéine-protéine ou protéine-ligands sans marquage, en parallèle, en temps réel et sur des volumes d'une fraction de microlitre d'échantillon.

Le TFPI-2, un gène suppresseur de tumeur

Pascale Reverdiau,
Unité INSERM U-618 « Protéases et vectorisation pulmonaires »,
IFR 135, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37 032 Tours Cedex.

Le cancer broncho-pulmonaire, première cause de mortalité par cancer chez l'homme, est un problème majeur de santé publique. La survie du malade dépend d'ailleurs tout particulièrement de la survenue de métastases. Pour former ces métastases à distance de la tumeur primitive, les cellules tumorales vont franchir de nombreuses barrières cellulaires et matricielles grâce, notamment, à des métalloprotéases (MMP).

L'activation des pro-MMP dépend essentiellement de protéases à sérine telles que la trypsine ou la plasmine. La présence du récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR) à la surface de nombreuses cellules tumorales leur confère la capacité d'activer le plasminogène en plasmine et ainsi de générer des MMP actives. L'inhibition de ces MMP est médiée par des inhibiteurs spécifiques, les TIMPs, mais plus récemment le rôle plus en amont d'une anti-protéase, le TFPI-2, a été évoqué.

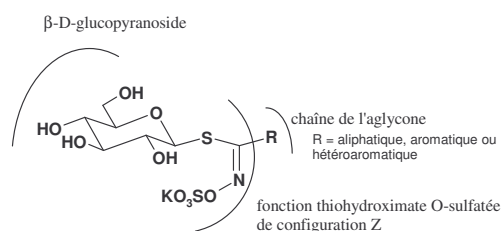
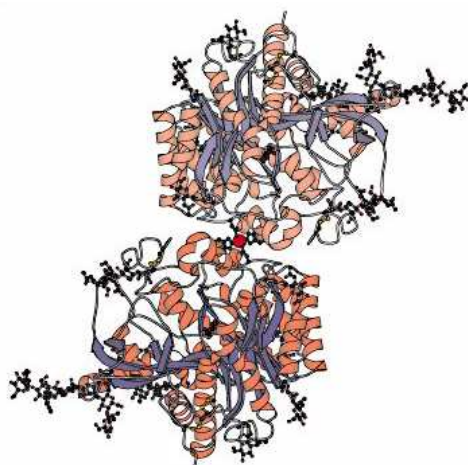
Le TFPI-2 (*Tissue factor pathway inhibitor 2*) également appelé protéine placentaire 5 (PP5) ou encore *matrix-associated serine protease inhibitor* (MSPI) et initialement isolé à partir du placenta humain, est aussi synthétisé par les cellules endothéliales, les cellules mésenchymateuses et épithéliales, les monocytes/macrophages et par de nombreuses cellules tumorales. En dépit des analogies de séquence et de structure avec le TFPI-1, inhibiteur majeur du complexe facteur tissulaire/facteur VIIa, le TFPI-2 inhibe peu le facteur Xa et régule donc faiblement la coagulation dépendante du facteur tissulaire. Le TFPI-2 est une glycoprotéine de 32 kDa, membre de la famille des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz, et est majoritairement sécrété vers la matrice extracellulaire où, en inhibant directement la plasmine, il peut réduire l'activation de plusieurs MMP. La régulation de la génération des MMP -1, -3 et -9 limite ainsi la protéolyse de la matrice et par conséquent la migration cellulaire et l'invasion tumorale. Plusieurs équipes ont ainsi établi un lien entre le niveau d'expression du TFPI-2 et la progression de certaines tumeurs. Le TFPI-2 est en effet faiblement synthétisé par les cellules tumorales particulièrement invasives et ce potentiel invasif peut être inhibé après restauration de l'expression du TFPI-2 ou après addition de TFPI-2 recombinant. A l'inverse, les cellules peu invasives expriment beaucoup de TFPI-2 et la régulation négative de son expression favorise alors l'invasion. Le faible niveau d'expression du TFPI-2 dans certaines cellules tumorales peut s'expliquer par la richesse du promoteur de son gène en résidus GC et la présence d'un îlot CpG dans la région encadrant les sites d'initiation de la transcription du gène. L'hyperméthylation de cette région promotrice serait associée à la répression transcriptionnelle du gène TFPI-2 dans plusieurs lignées de cellules ainsi qu'au sein de certaines tumeurs pulmonaires.

En conclusion, le rôle du TFPI-2 dans l'inhibition de l'invasion tumorale, la présence d'un îlot CpG dans la région promotrice du gène et le fait que l'hyperméthylation du promoteur soit corrélée à l'inhibition de la transcription devraient permettre à terme de classer le gène codant une anti-protéase dans le groupe des gènes suppresseurs de tumeur. Une meilleure connaissance des mécanismes régulant l'expression du TFPI-2 au sein de certaines tumeurs malignes pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses.

Chimio prévention et alimentation : le couple Glucosinolate/Myrosinase chez les Crucifères

Dr TATIBOUET Arnaud
Université d'Orléans, ICOA, UMR 6005
arnaud.tatibouet@univ-orleans.fr

Le goût si particulier des végétaux de la famille des Crucifères (choux, brocoli, radis, moutarde, navet, roquette, raifort...) est étroitement associé à l'action enzymatique de la myrosinase sur son substrat spécifique, le glucosinolate. Ce dernier est l'illustration parfaite d'une biomolécule soufrée. C'est un thiosaccharide présent dans 16 familles de dicotylédones angiospermes – notamment chez les crucifères - et représenté par plus de 120 composés différents.



Il joue un rôle de protection de la plante contre diverses agressions. Son action est celle d'une gâchette chimique capable, sous l'action de la myrosinase, de libérer des actifs moléculaires. Cette bio-activité se manifeste par un pouvoir anti-fongique et anti-bactérien mais surtout, par son implication importante dans la diététique humaine et la prévention de certains cancers (chimio-prévention). Notre recherche est orientée vers la clarification de l'action enzymatique particulière et unique de la myrosinase au moyen du développement d'inhibiteurs spécifiques ainsi que vers l'exploration chimique des actifs biologiques en vue d'une meilleure compréhension des mécanismes de chimio-prévention.

Références :

1. Burmeister W. P., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S., Henrissat B. *Structure* **1997**, 5, 663-675.
2. Fahey J. W., Zalcmann A. T., Talalay P. *Phytochemistry*, **2001**, 56, 5-51.
3. Cottaz S. *Regards sur la Biochimie* **1999**, 3, 23-31
4. Bourderieux A., Lefoix M., Gueyrard D., Tatibouët A., Cottaz S., Arzt S., Burmeister W. P., Rollin P. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1872 - 1879.

- Abdelkarim, 19
Alépée , 4,5
Ardourel, 9
- Barascu, 6
Barbaroux, 11
Barnes, 33
Belghazi, 7, 16
Belleannée, 7
Besson, 6
Biagini, 5
Bigot, 22
Blin J.,8
Blin M., 8, 9
Blond, 4
Boissel, 4
Bonhomme., 10, 11
Bonnet, 4
Borde, 4
Bougoux, 6
Bouguarne, 8
Boursier, 7
Brignolas, 10, 11
- Cadoret, 12
Cahoreau, 24
Canton, 9, 29
Carell, 13
Castaing, 13
Castella, 14
Catoire, 4
Chevalier, 4, 5
Chourpa, 25, 26
Cloix, 9
Cohen-Jonathanb, 25, 26
Combarnous, 24
Coste, 13
Coursaget, 20
Crepieux, 23
Crochet, 31
Crola, 15
- Da Silva
Dacheux F., 7, 14, 16
Dacheux JL, 7, 14, 16
Dalbies-Tran, 12
Decoville, 17
Delaunay, 33
Tesseraud, 31
Thévenot, 19
Tigrett, 29
- Denamur, 27
Domingo, 5
Douziech-Eyrolles; 26
Douziech-Eyrollesb, 25
Dreyer, 11
Druart , 7
Dubernet, 22
Dubois, 25, 26
Dufour, 9
Dupont, 31, 32
Duverger, 28
- Eichwald-Grondeux, 18
Erard, 30
Ernouf, 18
- Fajac, 19
Ferré, 31
Fleury, 20
Fontaine, 34
Fonteneau, 28
Foufelle, 31
Fouquenot, 25
Fragnet, 21
- Gauthier, 23
Gentil, 33
Germon, 22, 27
Grivennikov, 30
Grosse, 19
Guerif, 12
Guillard, 22
Guillou , 23, 34
- Hachani, 8, 9
Hagège, 33
- Janot, 30
Joseph, 33
Jotereau, 28
Jourdan, 6
- Kara, 23
Kieda., 15
Klett., 24
Krsnik-Rasol, 10
Kut, 21
- Labas, 7
Lamerant-Fayel, 15
Lanson, 16
Larrieu, 28
Laurent, 27
Le Floch, 6
Lefebvre, 33
Legardinier, 24
Linassierc, 25, 26
- Maillet, 30
Marchais; 25
Marchaisa, 26
Marron, 11
Martinat, 23
Masson, 4
Maury, 33
Meese, 11
Mercier, 9
Monclus, 10, 11
Monsigny, 19, 28
Morabito, 10, 11
Moulin-Schouleur, 27
Munnier; 26
- NGaboni, 25, 26
Ober, 13
- Pacaud-Mercier, 8, 29
Piketty, 23
Poirier, 24
Quentin, 27
Quesniaux, 30
- Rabut, 18
Rasschaert, 21, 27
Reiter, 23
Répérant, 27
Roche, 28
Royere, 12
Ryffel, 30
- Schouler, 27
Sedgwick, 30
Solnais, 32
Soucé, 25, 26
Srinivas, 28

Tissandier, 22
Torres, 30
Tosca, 31, 32
Touzé, 20
Viaud-Massuard, 22
Villar, 10, 11
Yefimova, 34
Zelwer, 13