



LES BIOSCIENCES
EN REGION CENTRE

ACTES

du

20^{ème} Colloque

BIOTECHNOCENTRE

25 - 26 Octobre 2007

Seillac (Loir et Cher)

Avec le concours du Conseil Régional du Centre



MChristian ANDRES
Université de Tours
andres@med.univ-tours.fr | netgrs.com

Christian BRETON
UAGPF - INRA Orléans
christian.breton@orleans.inra.fr

Stephan CHEVALIER
Centre de Recherche Pfizer
Stephan.chevalier@pfizer.com

Alain ROSSEL
CBM-CNRS
rousseau@cnrs-orleans.fr

Marc BERTRAND
Technologie Servier
marc.bertrand@fr.netgrs.com

Norbert Bromet
Biotec Centre
n.bromet@biotec-dmpk-adme.com

Daniel LOCKER
CBM-CNRS
locker@cnrs-orleans.fr

Marie-Claude VIAUD
Université de Tours
Marie-claude.viaud-masuard@univ-tours.fr

Président: Jean-Louis DACHEUX, UMR-INRA-CNRS 6073, NOUZILLY - Tél: 02 47 42 79 49 - Fax: 02 47 42 77 43 - Mèl: jldacheux@tours.inra.fr
Secrétariat: 36 avenue Léonard de Vinci, 37 400 AMBOISE - Tél: Fax: 02 47 30 02 63 - Mèl: biotechnocentre@wanadoo.fr

Le 25 et 26 Octobre 2007 se tiendra le 20^{ème} Colloque de Biotechnocentre. En 1987, quelques chercheurs et enseignants de la région Centre ont créé cette association afin de développer des relations professionnelles entre les Universités de Tours et Orléans et les laboratoires académiques et privés. Grâce au soutien du Conseil Régional et de la participation de nombreux chercheurs, Biotechnocentre a su créer un réseau de collaborations entre équipes régionales et permis le financement de nombreux projets par la recherches de financements au niveau ministériel, régional et des différents départementaux.

De nombreux liens se sont établis avec nos collègues du secteur privé aboutissant très souvent à des collaborations très fructueuses.

Ce vingtième colloque concrétise la vitalité de notre association et son implantation de la vie scientifique de la Région Centre.

Souhaitons que dans les prochaines années Biotechnocentre puisse continuer à jouer ce rôle fédérateur dans la région Centre.

Bon Colloque 2007.

Jean Louis DACHEUX
Président Biotechnocentre

Résumés des Posters.....	1
Résumés des Conférences.....	33
Index des Auteurs.....	41

POSTERS

- P1 – Impacts d’une surexpression de la protéase KLK6 sur la prolifération, l’adhérence et l’apoptose cellulaires.**
M. Ainciburu, E. Ernoult, M. Bahut, C. Coco, A. Lorthiois, C. Guette, N. Heuze-Vourc’h, Y. Courty.....4
- P2 – La Ligation triazole : développement d’un nouvel outil pour la synthèse de protéines et glycoprotéines artificielles.**
I. Valverde, V. Aucagne, A. Delmas.....5
- P3 – Propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de l’élafine et de son précurseur la trappine-2.**
K. Baranger, ML. Zani, J. Chandenier, S. Dallet-Choisy, T. Moreau.....6
- P4 – Chemical synthesis of Mitogaligin, a 97 amino acid protein**
P. Barta, P. Marceau, D. Lelièvre, V. Aucagne, A. Delmas.....7
- P5 – Diversité génétique de la productivité et de l’efficacité d’utilisation de l’eau chez les principaux hydrides de peuplier cultivés en peupleraie.**
L. Bonhomme, C. Barbaroux, R. Monclus, D. Morabito, M. Villar, E. Dreyer, F. Brignolas.....8
- P6 – Synthesis of mucin-type O-glycans in yeast**
S. Bourgerie, V. Piller, Friedrich Piller.....9
- P7 - Un Biacore T100 en région Centre**
S Canépa, MC Maurel.....10
- P8 – Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes pour l’analyse fine des acides nucléiques.**
M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, U. Asseline.....11
- P9 – Optimisation de la cartographie peptidique par addition d’éther couronne 18-C6.**
E. Cochet, V. Labas, JL Dacheux.....12
- P10 – Modification des pseudo-particules virales de papillomavirus afin d’exposer à leur surface la protéine mineure de capsid L2.**
N. Combelas, A. Touzé, M. Fleury, P. Coursaget.....13
- P11 – Comparaison de méthodes d’enrichissement des phosphopeptides par IMAC ou TiO2 pour leur analyse par spectrométrie de masse.**
D. Cornu, S. Bourassa, V. Labas, JL. Dacheux, G. G. Poirier, R. Faure.....14

- P12 – DSP1, une protéine de la famille HMG, fait partie de différents complexes multiprotéiques au cours du développement.**
M. Décoville, M. Rabhi, O. Lamiable, D. Locker.....15
- P13 – Ontogenèse des cellules Natural Killers dans l'intestin de l'animal nouveau-né et recrutement au cours de l'infection par *Cryptosporidium parvum* ; participation des cellules NK à la production précoce d'Interféron gamma.**
F. Drouet, R. Lemoine, J. El Hmouzi, Y. Le Vern, S. Lacroix-Lamandé, F. Laurent.....16
- P14 – Expression de gènes dans les cellules de cumulus chez l'humain : Une approche de la compétence ovocytaire.**
P. Feuerstein, V. Cadoret, R. Dalbies, F. Guérif, D. Royère.....17
- P15 – Cytotoxicité des nanotubes de carbones : influence du modèle cellulaire et de la fonctionnalisation des nanoparticules.**
M. Fisichella, H. Dabboue, S. Bhattacharyya, JP. Salvetat, T. Hevor, M. Guerin.....18
- P16 – In vitro reproduction of skin inflammation process.**
J. Franchi, C. Marteau, C. Crola da Silva, M. Mitterand, P. André, C. Kieda.....19
- P17 – Effet des lipides sur le transport actif des xénobiotiques chez les nématodes parasites.**
M. Garnier, M. Riou, C. Koch, F. Guégnard, Y. Le Vern, D. Kerboeuf20
- P18 – Le transcriptome épидидymaire chez le ver rat : Etude de la régionalisation.**
B. Guyonnet, JL Dacheux, F. Jaffrézic, A. Lacoste, G. Marot, MJ. Mercat, S. Schwob, JL. Gatti.....21
- P19 – Ultra-high resolution top down Fourier-transform mass spectrometry experiments reveal microheterogeneity of human salivary proteins.**
F. Halgand, S. Bassilian, P. Souda, V. Zabrouskov, J. Loo, K. Faull, D. Wong, J. Whitelegge.22
- P20 – Plate-forme de Proteomique Analytique et Fonctionnelle.**
V. Labas, JL. Dacheux, MC. Maurel, AP. Teixeira, S. Canepa, D. Cornu.....23
- P21 –The design of GAG-based glycoinhibitors of chemokine presentation.**
N. Lamerant-Fayel, JC. Jacquinet, C. Crola da Silva, K. Mleczko, P. Kabala, E. Landry, M. Mitterand, C. Kieda24
- P22 – Nebulization of an antitumor antibody : example of cetuximab.**
A. Maillet, N. Congy-Jolivet, S. Leguellec, L. Vecellio, S. Hamard, H. Watier, P. Diot, G. Thibault, Y. Courty, E. Lemarie, N. Heuzé-Vourc'h.....25
- P23 – Human endothelial stem cells : isolation, differentiation and phenotypic characterization.**
M. Paprocka, A. Krawczenko, E. Wojdat, J. Heimrath, C. Kieda, D. Dus.....26
- P24 – Capacité de soutien de l'hématopoïèse des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine différenciées dans la voie ostéoblastique.**

<i>T. Ribeiro, A. Langonné, B. Delorme, P. Charbord, J. Domenech.....</i>	<i>27</i>
P25 – Projet de constitution d’une plateforme de production et de cristallisation de protéine recombinante en région Centre.	
<i>A. Roussel.....</i>	<i>28</i>
P26 – Régulation par le monoxyde d’azote (NO) de la reconnaissance cellulaire lors de l’angiogenèse tumorale : Comparaison de lignées endothéliales organo-spécifiques.	
<i>A. Sélo, C. Kieda, C. Grillon.....</i>	<i>29</i>
P27 – Expression des oncomarqueurs dans les cellules germinales et embryons précoces bovins : aurora kinases et leur implication possible dans la maturation ovocytaire.	
<i>S. Uzbekova, R. Dalbies-Tran, P. Mermillod, C. Prigent, R. Uzbekov.....</i>	<i>30</i>
P28 – Régulation de l’activité protéolytique des cathepsines à cystéine extracellulaires par le peroxyde d’hydrogène : rôle protecteur de la catalase.	
<i>F. Veillard, V. Hervé-Grépinet, G. Godat, F. Lecaille, G. Lalmanach.....</i>	<i>31</i>
P27 – Bases moléculaires de la modulation de la réponse FSH et LH de la eCG induite par des anticorps anti-eCG potentialisants.	
<i>V. Wehbi, J. Decourtye, G. Durand, E. Reiter, MC Maurel.....</i>	<i>32</i>

Impacts d'une surexpression de la protéase KLK6 sur la prolifération, l'adhérence et l'apoptose cellulaires.

AINCIBURU M (1), ERNOULT E (2), BAHUT M (2), COCO C (1), LORTHIOIS A. (1),
GUETTE C (2), HEUZE-VOURC'H N (1), COURTY Y (1)

(1) INSERM U618, Faculté de Médecine, Tours – France ; (2) INSERM U564, Centre Paul Papin,
Angers - France

Les kallicroïnes tissulaires (KLK) humaines ont récemment émergé comme une famille de protéases à sérine pouvant jouer un rôle important dans la progression tumorale. Cette famille comprend 15 gènes exprimés au niveau des épithélia glandulaires et dont l'expression est altérée dans diverses pathologies tumorales. C'est le cas notamment de *KLK6* qui est surexprimé dans des cancers broncho-pulmonaires. L'objet du travail a été d'analyser *in vitro* l'impact d'une telle surexpression sur différents processus cellulaires.

Les lignées humaines HEK-293 Flp-In et A549 Flp-In ont été transformées stablement avec des ADNc codant des formes zymogènes de KLK6. Nous avons réalisé différents tests afin de déterminer les effets de la surexpression de proKLK6 sur la croissance, l'adhérence et l'apoptose de ces deux types cellulaires. Une étude protéomique en 2D-DIGE a permis de comparer le profil protéique de la lignée parentale HEK 293 Flp-In avec celui de la lignée surexprimant pro-KLK6. Les protéines d'expression altérée ont été identifiées par analyse des données obtenues par spectrométrie de masse dans la banque de données MASCOT.

Les clones cellulaires recombinants obtenus pour les deux lignées expriment la proforme de KLK6 qui est sécrétée par les cellules dans le milieu de culture. L'expression de proKLK6 augmente significativement la croissance et la résistance à l'apoptose des cellules. L'adhérence à différents constituants de la matrice extracellulaire est également modifiée. L'étude protéomique a révélé des variations d'expression d'une quarantaine de protéines, dont certaines sont connectées avec le cycle cellulaire.

La ligation triazole : développement d'un nouvel outil pour la synthèse de protéines et glycoprotéines artificielles

Ibai Valverde, Vincent Aucagne et Agnès Delmas.

Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 Avenue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex2.

La réaction d'un alcyne terminal avec un azoture en présence de cuivre (I) mise au point par les groupes de Sharpless et Meldal en 2002 ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la ligation chimique.⁽¹⁾ La fonction résultante, un hétérocycle de type triazole possède des propriétés intéressantes : elle est non-hydrolysable, stable en milieu biologique et constitue un bon mime de liaison peptidique.⁽²⁾ Cette condensation hautement chimiosélective a déjà fait ses preuves dans notre laboratoire en permettant des assemblages moléculaires de plusieurs blocs en *one pot* par une méthode simple et efficace⁽³⁾ révélant ainsi une excellente méthode de ligation non native potentiellement plus performante que celles développées jusqu'ici. En effet, cette « ligation triazole » se distingue par l'inertie chimique des groupements fonctionnels azotures et alcynes en absence de catalyseur et par les conditions réactionnelles neutres et particulièrement douces, pleinement compatibles avec des composés tels que les glyco-, phospho- et sulfopeptides. Dans le but d'appliquer ce concept à la multiligation de peptides et la synthèse de protéines et de glycoprotéines artificielles, nous avons testé méthodiquement la stabilité de différents groupements protecteurs silylés de la fonction alcyne terminale.

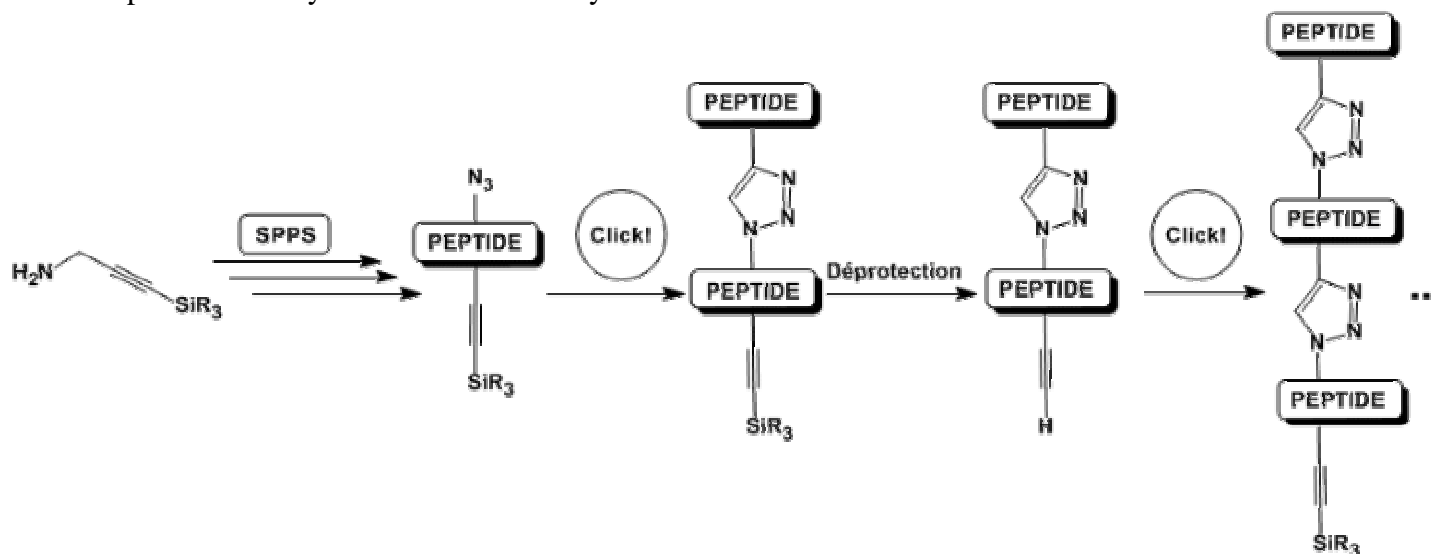


Figure 1. Schéma de principe de multiligation triazole

- (1) (a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. (b) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216. (c) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
 (2) Horne, W. H.; M. K.; Yadav; Stout, D.; Ghadiri, M. R. **2004**, *126*, 15366-15367
 (3) Aucagne, V.; Leigh, D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507

*Correspondance: aucagne@cns-orleans.fr

P3

**Propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de l'élafine
et de son précurseur la trappine-2.**

BARANGER K., ZANI ML., CHANDENIER J., DALLET-CHOISY S. et MOREAU T.

**Inserm U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires et IFR135 Imagerie Fonctionnelle,
Faculté de Médecine, Université François Rabelais, TOURS, France**

E-mail : moreaut@univ-tours.fr

L'ouverture des poumons vers l'environnement extérieur fait qu'ils constituent la porte d'entrée de pathogènes divers pouvant entraîner l'apparition de pathologies spécifiques ou des complications dans des maladies telles que la BPCO ou la mucoviscidose. En réponse à ces micro-organismes, les cellules épithéliales et les cellules de la défense immunitaire comme les macrophages et les neutrophiles vont sécréter des peptides anti-bactériens au niveau pulmonaire. Parmi ces peptides, on trouve en plus des défensines et des cathélicidines, des protéines cationiques comme l'élafine, son précurseur la trappine-2 et le SLPI, qui sont également des inhibiteurs de protéases à sérine de neutrophiles (HNE, CatG et Pr3).

Dans cette étude, nous avons analysé l'activité anti-bactérienne et anti-fongique de la trappine-2 vis-à-vis de micro-organismes à tropisme pulmonaire comme *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. Nous avons montré que la trappine-2 possède une activité anti-bactérienne et anti-fongique vis-à-vis des organismes testés. Un mutant de trappine-2 ayant perdu sa capacité inhibitrice présente les mêmes propriétés antibactériennes que la trappine-2 sauvage. Ceci laisse penser que le mode d'action de ces molécules est indépendant de leur activité anti-protéasique mais serait dépendant de leur caractère cationique comme l'atteste l'observation selon laquelle l'activité anti-bactérienne est inhibée par l'héparine et le NaCl.

En conclusion, les propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de la trappine-2 renforcent son potentiel anti-protéasique dans le cadre d'une utilisation thérapeutique anti-inflammatoire visant à cibler les protéases à sérine de neutrophile dans les pathologies pulmonaires.

Chemical synthesis of Mitogaligin, a 97 amino acid protein

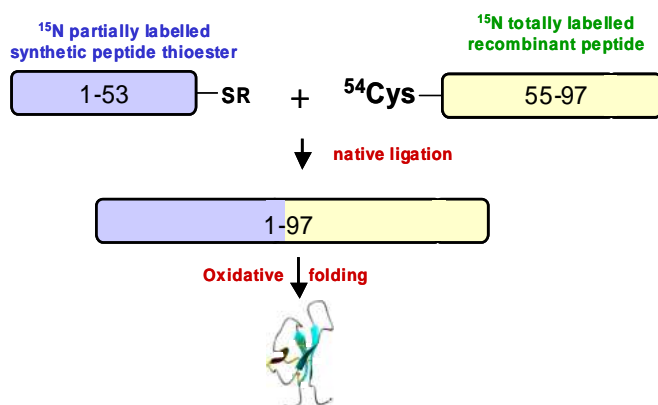
Pavel Barta, Philippe Marceau, Dominique Lelièvre, Vincent Aucagne, Agnès Delmas*

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

Mitogaligin, a 97 amino acids protein, is coded by the gene *galig*.^[1] Several lines of evidence suggest that mitogaligin is involved in a new cell death pathway.^[2]

MAWRMGEPACWGRGLPRGFLSWGLPRAGTPRGLSWTGTSRRLPWSTWLSLRST⁵⁴C
WSLPRATQRPWGL PIFWTAKCPRSLPCHWPLWRPCWATDCAL

It binds to mitochondria with a specificity to cardiolipin, an anionic phospholipid absent from all other eukaryotic cell membranes. The mitochondrial addressing of mitogaligin relies on the 31-53 fragment (underlined) which promotes the release of cytochrome c. In order to better understand the molecular mechanisms responsible for mitogaligin toxicity, our long term project is to determine the 3D structure of mitogaligin by NMR in the presence of mitochondrial membranes.



However, the cytotoxicity of mitogaligin and its mitochondrial addressing fragment prevent the production by conventional recombinant means. An alternative to produce 15N labelled mitogaligin at a reasonable cost is to use native chemical ligation and a combination of chemical and recombinant synthesis for the two fragments.

In a first approach, mitogaligin synthesis was carried out by classical stepwise chemical synthesis. The purity of the crude was enhanced using Fmoc-Asp(Mpe)-OH to minimize the formation of aspartimide, PEGA resin and pseudoproline dipeptides to lower the amount of truncated peptides and doing the final deprotection under argon atmosphere to prevent oxidation of methionines. Oxidative folding was carried out in the presence of redox agents.

In a second approach, the two fragments Met¹-Thr⁵³ thioester and Cys⁵⁴-Leu⁹⁷ were assembled by native chemical ligation. As C-terminal peptide thioesters are key intermediates in native chemical ligation, we are developing a strategy inspired from side chain anchoring strategy^[3] to synthesize [Met¹-Thr⁵³]-thioester by Fmoc strategy taking advantage of Ser⁵². The feasibility of this strategy will be presented using short peptides, with a special care to minimize racemization during the introduction of the amino acid thioester.

References

- 1- Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J. & Legrand, A. (2001) Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode galectin-3. *J. Biol. Chem.* 276:2652-2657.
- 2- Duneau M, Boyer-Guittaut M., Gonzalez P., Charpentier S., Normand T, Dubois M, Raimond J & Legrand A. (2005) Galig, a novel cell death that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp. Cell. Res.* 302:194-205.
- 3- Wang P. & Miranda LP. (2005) Fmoc-Protein Synthesis: Preparation of Peptide Thioesters Using a Side-Chain Anchoring Strategy. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 11, 117-123

Diversité génétique de la productivité et de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les principaux hybrides de peuplier cultivés en peupleraie

Bonhomme L., C. Barbaroux, R. Monclus[†], D. Morabito, M. Villar, E. Dreyer et F. Brignolas

Les liens entre productivité (P), traits foliaires et efficacité d'utilisation de l'eau ont été étudiés dans une peupleraie commerciale à partir de 14 hybrides de peupliers (*P. x euramericana* et *P. x interamericana*) dont l'âge variait de 6 à 14 ans. En 2005, 357 individus ont été étudiés sur deux types de stations, alluviale et non alluviale, contrastées par la fertilité de leurs sols et leur disponibilité en eau. En 2006, l'expérience a été répétée à partir des plants de la station alluviale uniquement. La productivité des plants a été estimée à partir de l'incrément radial annuel moyen (P). Les traits foliaires comprenaient la surface massique (SLA) et les teneurs en azote et en carbone des feuilles. L'efficacité d'utilisation de l'eau a été estimée indirectement à partir de la discrimination isotopique du carbone de la matière organique des feuilles (ΔI) et de la sève élaborée (Δs).

Pour les deux stations et quelle que soit l'année, une forte diversité génétique a été observée pour toutes les variables. Une corrélation entre ΔI et Δs a été détectée alors qu'aucun lien n'a pu être mis en évidence entre P et ΔI ou Δs . Le classement des génotypes demeurait stable entre 2005 et 2006 pour toutes les variables, alors qu'il différait largement entre les 2 stations une même année. Comparés à la station alluviale, les génotypes cultivés en station non alluviale étaient caractérisés par une plus faible productivité, des surfaces massiques inférieures et des teneurs en azote et en carbone des feuilles moins élevées. Il a été également constaté que le classement des génotypes pour ΔI mesuré dans la station alluviale était comparable à celui précédemment établi en serre pour des boutures âgées de 3 mois.

Synthesis of mucin-type O-glycans in yeast

Sylvain Bourgerie, Véronique Piller and Friedrich Piller

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301 affiliated to INSERM and the Université d'Orléans, Orléans

Yeast is one of the most widely used recombinant protein expression systems. As a true eukaryotic organism yeast provides most post-translational modifications necessary for the successful expression of correctly folded active proteins. However, its utility is hampered by the differences in glycosylation between mammalian cells and yeast. Recently, yeast N-glycosylation which differs from mammals only in the periphery has been successfully modified yielding complex type glycans in yeast.

Yeast O-glycosylation is completely different from mammalian mucin type O-glycosylation. It is initiated in the ER and consists only of Man residues linked in α to Ser or Thr. Mammalian mucin-type O-glycosylation starts in the Golgi apparatus by the addition of GalNAc to Ser or Thr which is then further elongated by the addition of various sugar residues.

In order to introduce efficient mucin O-glycosylation into yeast it was important to reduce endogenous O-mannosylation by the inactivation of the principal protein mannosyl transferase (PMT1). In mammals GalNAc is added to the protein by the Golgi polypeptide transferases one of which had to be introduced into yeast to obtain mucin O-glycans. However, in order to compete more efficiently with the exogenous enzymes for the peptide acceptor substrates, an ER retention sequence was added to the GalNAc transferase which allowed the expression of the active enzyme in the ER.

Yeast does not synthesize UDPGalNAc, the donor substrate for the GalNAc transferase, and therefore the UDPGal(NAc)-4-epimerase from *Bacillus subtilis* was expressed as well. However, nucleotide sugars are synthesized in the cytosol and need to be transported by specific transporters into the lumen of the ER or the Golgi apparatus. For that reason the hamster UDP-Gal(NAc) transporter equipped with an ER localization tag was co-expressed in the modified yeast strain.

Yeasts expressing these three foreign proteins were able to add α linked GalNAc to endogenous (chitinase) and exogenous (MUC1) glycoproteins. The presence of GalNAc was determined by immunofluorescence and Western blotting with the GalNAc specific lectin from *Vicia villosa* and by mass spectroscopic analysis of the purified O-glycosylated proteins.

Un Biacore T100 en région Centre

Sylvie Canépa et Marie-Christine Maurel

Atelier Biacore, UMR PRC, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, prcbiacore@tours.inra.fr

Un Biacore T100 est installé depuis peu au centre INRA de Tours. Cet appareil a été cofinancé par la région Centre, l'INRA et le CNRS. Il est ouvert à l'ensemble de la communauté scientifique. Son domaine d'application est l'analyse des interactions entre biomolécules (protéines, DNA, RNA, polysaccharides, lipides, voire virus et cellules) par une technique de détection utilisant la Résonance Plasmonique de Surface (SPR).

Les principales évolutions de ce Biacore nouvelle génération, par rapport à des versions plus anciennes, sont 1] une amélioration de la sensibilité permettant l'analyse de petites molécules (jusque 100 Da) et l'analyse en présence de milieux complexes (DMSO, plasma), 2] une enceinte de travail thermostatée avec une gamme de températures opérationnelle de 4° à 45°C, un dégazeur intégré empêchant l'apparition de bulles d'air aux températures élevées, 3] la possibilité de récupérer le partenaire moléculaire inconnu qui s'est spécifiquement lié à la molécule immobilisée, 4] un environnement « qualité » (automatisation poussée, méthodes « wizards », pré tests de validation).

Les principales applications qui peuvent être développées avec le Biacore T100 sont de 1] caractériser et quantifier des cinétiques et des affinités d'interaction entre, par exemple, petites molécules, surnageants d'hybridomes ou molécules recombinantes... et leur ligand, 2] caractériser des interactions multiples (cartes épitopiques) ou complexes (cascades moléculaires), 3] caractériser et quantifier des constantes de thermodynamie en analysant la même interaction à différentes températures, 4] déterminer des concentrations (biomédicaments, stéroïdes de synthèse...), 5] récupérer le partenaire inconnu d'une interaction et l'identifier en spectrométrie de masse.

Cette dernière application sera développée en commun avec l'atelier de Spectrométrie de Masse du centre INRA de Tours au sein de la Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle (PPAF).

Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes pour l'analyse fine des acides nucléiques

M. Chassignol, Y. Aubert, V. Roig, U. Asseline

*Centre de Biophysique Moléculaire - UPR 4301 CNRS conventionnée avec l'Université d'Orléans
et avec l'INSERM, Rue Charles Sadron, 45071- Orléans cedex 2*

Les sondes oligonucléotidiques sont des outils d'analyse très puissants qui trouvent des applications dans de nombreux domaines: recherche fondamentale, médecine (diagnostic, pronostic et aide au traitement...), agroalimentaire, environnement, nanotechnologies.... Ces applications sont basées sur les propriétés d'hybridation des oligonucléotides qui sont capables de reconnaître leurs séquences complémentaires sur les fragments d'acides nucléiques à analyser. Les hybrides parfaits sont plus stables que les hybrides imparfaits. Cependant, la stabilité des hybrides dépend également de leur composition en bases. Ainsi la stabilité d'hybrides imparfaits riches en paires C:G peut être supérieure à celles d'hybrides parfaits comportant un plus grand nombre de paires A:T. D'autre part, la différence de stabilité entre les hybrides parfaits et les hybrides imparfaits est faible lorsque les mésappariements sont situés à l'extrémité des hybrides, ce qui rend les analyses difficiles lorsqu'un grand nombre d'échantillons sont étudiés en parallèle.

Dans le but de contribuer à remédier à ce problème nous avons développé de nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes qui permettent, en hybridant toutes les sondes à la même température, de distinguer les hybrides parfaits de ceux comportant des mésappariements en position terminale, aux deux dernières positions ou en avant-dernière position. Les hybrides comportant les mésappariements sont plus fluorescents que les hybrides parfaits. Ces nouvelles sondes peuvent être utilisées pour étudier les mutations et peuvent trouver des applications dans les méthodes de séquençage par hybridation.

Optimisation de la cartographie peptidique par addition d'éther couronne 18-C-6

Cochet E, Labas V, Dacheux JL

Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle, Centre de Recherches INRA de Tours,
F-37380 Nouzilly, France

Les techniques d'ionisation de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse (MALDI ou ESI) permettent l'observation d'ions protonés mais aussi d'adduits avec le potassium et le sodium. Ces sels sont présents dans les systèmes biologiques (cellules, fluides) mais également dans les systèmes préparatifs (tampons) lors de l'analyse protéomique. Cependant, la spectrométrie de masse est peu tolérante à la présence de sels.

En effet, lors de la cartographie peptidique MALDI-TOF, en présence de sels, la formation d'adduits sur les espèces peptidiques diminue le seuil de sensibilité et la multiplication des clusters de matrice génère la suppression des signaux dans les faibles m/z (<1000).

Le dessalage des échantillons peptidiques fait appel à des procédés reposant sur la chromatographie liquide à phase inverse, cependant ces derniers sont coûteux, fastidieux et inefficaces pour l'élimination totale des sels (présence à l'état de traces).

Afin de s'affranchir des problèmes liés à leur présence, nous avons optimisé un procédé chimique de dessalage des échantillons peptidiques, basé sur l'utilisation de chélateur cationique par l'addition d'éther couronne 18-C-6. Les effets et limites de ce chélateur ont été étudiés par MALDI-TOF à l'aide d'extraits peptidiques de Serum Albumine Bovine.

Par l'addition de 18-C-6 éther couronne dans la matrice (CHCA), cette étude montre, que l'élimination de 70% des clusters de matrice permet l'observation de nouveaux peptides d'intérêt dans les faibles m/z , et que l'élimination des adduits augmente le seuil de sensibilité. Par conséquent, la meilleure qualité des cartographies permet l'obtention de scores d'identifications plus élevés.

De plus, notre étude montre que l'identification de protéines par cartographie MALDI-TOF, en présence de crown éther, peut être réalisée en présence de 2 mM KCl et 90 mM NaCl.

Ainsi, notre étude a montré que la tolérance du MALDI pour le K^+ et Na^+ est augmentée d'un facteur 3 en présence de crown éther.

Modification des pseudo-particules virales de papillomavirus afin d'exposer à leur surface la protéine mineure de capsid L2

Nicolas Combelas, Antoine Touzé, Maxime Fleury et Pierre Coursaget

INSERM U618, Equipe « Vecteurs, Virus et Vaccins », UFR des Sciences Pharmaceutiques
"Philippe Maupas", 31 avenue Monge, 32700 TOURS.

Les papillomavirus à « haut risque » sont impliqués dans 99,7% des cancers du col de l'utérus, 2^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde chez la femme. Les vaccins prophylactiques développés à partir de VLP composées de la protéine L1 des HPV 16 et 18 assurent une protection de 100% contre les lésions induites par ces deux génotypes impliqués dans 70% des cancers du col. Afin de prévenir les 30% restants, l'inclusion des 13 autres génotypes à « haut risque » paraît peu envisageable. L'utilisation de la protéine mineure de capsid L2 qui induit des anticorps cross-neutralisants semble être une solution rationnelle. Cependant, les études réalisées indiquent que l'immunisation avec des VLP L1/L2 ou avec la protéine L2 recombinante ne permet d'obtenir que de faibles titres d'anticorps. Afin d'augmenter la réponse anti-L2, nous avons développé une approche visant à exposer la protéine L2 à de multiples copies à l'extérieur des VLP.

Le motif StrepTagII, peptide de 8 acides aminés mimant la biotine, a été inséré au niveau de la boucle DE de la protéine L1 de l'HPV 16. Cette protéine exprimée en cellules d'insecte s'auto-assemble en VLP. La protéine L2 a été fusionnée à la Streptactine afin de la complexer avec les VLP produites. La fixation de la protéine L2-Streptactine sur les VLP a été mise en évidence. L'immunogénicité de ces complexes sera évaluée chez la souris.

Mots clés : HPV, VLP, protéine de capsid L1 et L2, StrepTagII/Streptactine, neutralisation croisée.

**Comparaison de méthodes d'enrichissement des phosphopeptides par IMAC ou TiO₂
pour leur analyse par spectrométrie de masse.**

David Cornu ¹, Sylvie Bourassa ², Valérie Labas ¹, Jean-Louis Dacheux ¹, Guy G. Poirier ² et Robert Faure ³.

¹ **Centre INRA de Tours**, *Service de Spectrométrie de Masse, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements*, UMR INRA CNRS 6175 INRA 37380 Nouzilly, France.

² **Plate-forme de Protéomique du Centre de génomique de Québec**, *Service de spectrométrie de masse, Endocrinologie moléculaire et oncologique*, Centre de Recherche du CHUL, 2705 boulevard Laurier, T-3-67 Québec, Canada G1V 4G2.

³ **Département de pédiatrie**, Centre de Recherche du CHUL, 2705 boulevard Laurier, RC-9800 Québec, CANADA G1V 4G2.

La phosphorylation des protéines est une des plus importantes modifications post-traductionnelles impliquées dans la signalisation cellulaire. Ainsi la détermination des sites de phosphorylation est essentielle pour la compréhension de la régulation de processus cellulaires clés tels que la transduction. La phosphorylation est une modification de la chaîne latérale des acides aminés sérine, thréonine et tyrosine par addition de groupements phosphate qui est catalysée par des enzymes : les protéines kinases. En raison de la faible stoechiométrie de la réaction de phosphorylation et de la difficile ionisation des phosphopeptides, la détection de phosphopeptides et la localisation de sites de phosphorylation restent encore un déficit de taille même sur des protéines hautement purifiées. Des étapes d'enrichissement pour isoler les phosphopeptides d'un mélange complexe s'avèrent donc nécessaires. Le travail non exhaustif présenté ici a pour ambition de rendre compte de quelques unes des techniques les plus utilisées d'enrichissement des phosphopeptides par chromatographie d'affinité IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) ou encore par TiO₂ et de les comparer en utilisant la spectrométrie de masse. Les protéines tests utilisées pour ces comparaisons sont la β -caséine et l'ovalbumine.

P12

DSP1, une protéine de la famille HMG, fait partie de différents complexes multiprotéiques au cours du développement.

Decoville, M., Rabhi, M., Lamiable, O., Locker, D.

La mémoire cellulaire permet à une cellule de maintenir de manière stable des gènes activés ou réprimés. Par exemple, chez la drosophile, le profil d'expression des gènes Hox est maintenu pendant tout le développement embryonnaire, puis au cours de la vie larvaire par des mécanismes de mémoire cellulaire impliquant les gènes du groupe *trithorax* (*Trx-G*) et les gènes du groupe *Polycomb* (*Pc-G*). Les gènes *trx-G* maintiennent un état activé alors que les gènes *Pc-G* maintiennent un état réprimé. Ces deux groupes de gènes maintiennent l'état transcriptionnel de leurs gènes cibles en modifiant les histones (acétylation, méthylation et phosphorylation). Pour cela les protéines *Pc-G* et *Trx-G* s'associent en complexes multimériques dont la composition peut-être très dynamique. Le but de notre travail est de caractériser la fonction d'un membre des *Pc-G* et *Trx-G* : la protéine DSP1 (Dorsal Switch Protein). C'est une protéine de 47 kDa qui agit soit comme *Pc-G* soit comme *Trx-G* suivant le locus considéré, et participe au remodelage local de la chromatine. Nous avons montré que DSP1 participait au recrutement de protéines *Pc-G*, DSP1 a donc un rôle primordial dans le processus de mémoire cellulaire. DSP1 peut agir soit comme un facteur architectural de la chromatine qui facilite l'accès des complexes *Pc-G* ou *Trx-G* à la chromatine, soit comme un partenaire des *Pc-G* ou *Trx-G* dans les complexes multimériques. Jusqu'à présent DSP1 n'a pas été identifiée dans les complexes *Pc-G* (PRC1, PRC2) ou *Trx-G* (TAC1, BRM) purifiés. Nous montrons ici que la protéine DSP1 est impliquée dans des complexes de taille allant de 150 à plus de 600 kDa au cours de l'embryogénèse. Nous avons réalisé une étude de la dynamique de ces complexes en recherchant sur gradient de glycérol des complexes protéiques contenant DSP1 à différents stades de développement. Nous montrons que la taille de ces complexes évolue en fonction du stade de développement et nous proposons un modèle qui peut rendre compte de ces résultats.

Ontogenèse des cellules Natural Killers dans l'intestin de l'animal nouveau-né et recrutement au cours de l'infection par *Cryptosporidium parvum* ; participation des cellules NK à la production précoce d'Interféron gamma.

F. Drouet (1), R. Lemoine (1), J. El Hmouzi (1), Y. Le Vern (2), S. Lacroix-Lamandé (1), F. Laurent (1).

INRA UR IASP-1282, 37380 Nouzilly, (1) équipe CIMEN, (2) service commun de Cytométrie.

La cryptosporidiose est une zoonose due au protozoaire parasite *Cryptosporidium parvum*. Nous cherchons avec un modèle de raton nouveau-né à identifier les toutes premières cellules qui produisent l'interféron gamma (IFN γ), cytokine primordiale pour la résolution de cette infection. Nous avons focalisé notre recherche sur les cellules Natural Killers (NK) impliquées dans la réponse immunitaire innée et les lymphocytes T dont la réponse spécifique est plus tardive. Nous avons étudié, par immunohistologie, l'ontogenèse des cellules NK et des lymphocytes T chez l'animal sain et analysé l'influence de l'infection sur le recrutement de ces populations de lymphocytes dans l'intestin. Nous avons mis en évidence la présence de cellules NK (CD161+) dès le jour de la naissance alors que les lymphocytes T CD3+ n'apparaissent qu'à partir du 4^{ème} jour de vie. Ces deux populations augmentent rapidement au cours des deux premières semaines de la vie. Les cellules NK sont majoritaires chez le raton au cours des 15 premiers jours alors que les lymphocytes T CD3+ le deviennent à l'âge du sevrage (21 jours). Lors de l'infection nous n'avons pas observé de recrutement important de cellules NK dans la muqueuse intestinale.

Nous avons analysé la production d'IFN γ dans la muqueuse intestinale infectée. L'expression des ARNm de l'IFN γ dans l'iléon (broyat tissulaire), déterminée par RT-PCR quantitative, augmente significativement 4 jours post inoculation, alors que les cellules NK sont nombreuses dans la muqueuse iléale et que les lymphocytes T CD3+ commencent seulement à apparaître. Ces données sont en faveur d'une participation importante des cellules NK à la production locale d'IFN γ .

Nous avons donc analysé la production d'IFN γ par les cellules NK de l'intestin par cytométrie en flux. La proportion des différents types de lymphocytes qui produisent de l'IFN γ a été évaluée sur les cellules isolées à partir de l'intestin de rats traités *in vivo* à la Bréfeldine A. Cet essai préliminaire, nous a permis de montrer que, 48 heures post inoculation, chez des animaux de 5 jours, les deux types de lymphocytes, NK et T, produisent de l'IFN γ . Toutefois, il semble que ce soit dans la population NK que la proportion de cellules productrices d'IFN γ est la plus nombreuse.

Ces résultats confortent notre hypothèse que les cellules NK sont impliquées dans la réponse précoce à l'infection par *Cryptosporidium parvum*. Il faut maintenant préciser leur contribution.

**Expression de gènes dans les cellules de cumulus chez l'humain :
Une approche de la compétence ovocytaire**

Feuerstein P., Cadoret V., Dalbies-Tran R., Guérif F., Royère D.

UMR 6175 INRA/CNRS/ Haras nationaux/ Université François Rabelais, Tours
Biologie de la Reproduction, CHRU Bretonneau, Tours

Définir la qualité ovocytaire reste un des enjeux majeurs en reproduction humaine lors des procédures d'assistance médicale à la procréation. La capacité d'un ovocyte à soutenir le développement embryonnaire précoce est dépendante de la croissance et maturation folliculaire. Le dialogue entre l'ovocyte et les cellules du cumulus qui l'entourent va alors contribuer à l'acquisition de cette compétence, via notamment l'expression de gènes spécifiques. Notre objectif est donc d'évaluer l'expression de gènes dans les cellules du cumulus, en fonction d'une part de la maturité nucléaire de l'ovocyte, et d'autre part de sa maturité cytoplasmique correspondant à sa capacité à soutenir les premiers stades du développement embryonnaires après la fécondation.

Lors des procédures d'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection), chaque complexe ovocyte-cumulus est individuellement dissocié. Le suivi de l'ovocyte correspondant est ensuite réalisé en terme de maturité nucléaire (absence ou reprise de méiose) puis en terme de développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste, 5 à 6 jours après la fécondation.

Les variations du niveau d'expression de 5 gènes ont été étudiées par PCR en temps réel. Ces gènes ont été choisis pour leur régulation connue par les hormones gonadotropes: *Steroidogenic Acute Regulatory protein (STAR)*, *Cyclooxygenase 2 (COX2)*, *Amphiregulin (AREG)*, *Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 et 5 (SCD1 et SCD5)*. Une augmentation significative de l'expression de ces gènes accompagne la maturation nucléaire de l'ovocyte. En revanche, cette expression est plus faible dans le cumulus entourant un ovocyte qui atteint le stade blastocyste après 5 à 6 jours de culture comparé à un ovocyte qui stoppe son développement embryonnaire. Cette diminution peut être interprétée comme une 'consommation' du produit de l'expression de ces gènes (ARNm) pour soutenir un développement embryonnaire correct.

Nos résultats établissent un lien entre l'expression de gènes dans le cumulus et la qualité ovocytaire. L'identification, par microarray, toujours à l'échelle d'un cumulus unique, d'autres gènes liés à l'acquisition de la compétence ovocytaire est en cours. Ceci pourrait permettre une approche non invasive mais prédictive pour le transfert embryonnaire chez la femme.

**Toxoplasmose et vaccination par des cellules dendritiques
et des exosomes dérivés.
Cytotoxicité des nanotubes de carbones: influence du modèle cellulaire et
de la fonctionnalisation des nanoparticules**

Matthieu Fisichella^(a, b), Hinda Dabboue^(a), Sanjib Bhattacharyya^(a), Jean-Paul Salvetat ^(a), Tobias Hevor^(b), Martine Guerin^(b).

a) CNRS, Centre de Recherche sur la Matière Divisée, UMR6619, Orléans, France.

b) Laboratoire de Neurobiologie, UPRES EA 2633, Université d'Orléans, Orléans, France.

Les nanotubes de carbone ont un potentiel important pour différentes applications biomédicales. Malgré de nombreuses études consacrées à leur toxicité, aucun consensus n'apparaît quant à leur biocompatibilité du fait de résultats souvent contradictoires. Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces divergences. La pureté des nanotubes, leurs fonctionnalisations, ou encore leur dispersion ont été évoquées. Cette étude va permettre d'évaluer la cytotoxicité des nanotubes de carbone de différentes structures (Simple et multi parois) non greffés ou greffés de polyéthylène glycol couplé au FITC sur différents modèles cellulaires (cellules HeLa et NIH/3T3). Nous avons observé que les nanotubes de carbones n'induisaient pas de cytotoxicité sur les cellules HeLa alors qu'un effet toxique marqué est visible sur les cellules NIH/3T3. Cette différence d'effets ne provient pas d'une différence de métabolisme ou de propriétés d'adhérence des cellules. De plus, la fonctionnalisation des SWCNT réduit de manière importante la cytotoxicité de SWCNT et les MWCNT paraissent moins toxiques que les SWCNT.

La cytotoxicité des nanotubes de carbone dépend donc de manière importante du modèle cellulaire étudié. La cytotoxicité est également liée à la nature chimique de la surface des nanotubes de carbone ; celle-ci peut être modifiée par fonctionnalisation et donc permet d'améliorer la biocompatibilité des nanotubes de carbones. Enfin, la surface ou la taille des nanotubes de carbones jouent également un rôle dans leur cytotoxicité.

Effet des lipides sur le transport actif des xénobiotiques chez les nématodes parasites

Marie Garnier, Mickaël Riou, Christine Koch, Fabrice Guégnard, Yves Le Vern, Dominique Kerboeuf

Centre INRA de Tours, Unité Infectiologie Animale et Santé Publique, 37380 Nouzilly, France

L'efficacité des traitements anthelminthiques des petits ruminants contre les nématodes est compromise par l'émergence de chimiorésistances. A côté des mécanismes spécifiques associés à des mutations de cibles cellulaires des anthelminthiques, nous avons montré précédemment que la résistance aux anthelminthiques dépend aussi très fortement de la présence de pompes membranaires telles que les P-glycoprotéines (P-gp), membres de la famille des ABC transporteurs provoquant l'efflux accéléré des drugs. L'activité de ces pompes est elle-même influencée par la composition lipidique membranaire. Les relations P-gp / lipides sont spécifiées ici. L'activité des P-gp est significativement corrélée avec la teneur en cholestérol des œufs de nématodes, spécialement avec le cholestérol libre (CL). De plus, l'efflux des xénobiotiques par les P-gp et la résistance aux anthelminthiques sont significativement corrélées avec le ratio CL / phospholipides (PLs) en particulier la phosphatidylcholine (PC) présente dans le feuillet externe des membranes cellulaires. Ces résultats suggèrent que la distribution respective du cholestérol et des PLs à l'intérieur des membranes pourrait influencer la conformation et l'activité des P-gp. Des résultats similaires obtenus avec les cellules de vertébrés ont permis d'identifier des microdomaines lipidiques membranaires avec une concentration élevée de cholestérol et la présence de lipides spécifiques (ganglioside GM1, PC) où une partie des P-gp sont piégées et acquièrent la conformation active. Grâce à un marqueur fluorescent se fixant spécifiquement au ganglioside GM1, nous avons aussi identifié de tels microdomaines chez les œufs de nématodes. La comparaison de plusieurs isolats avec des niveaux de résistance différents a montré que les œufs résistants contenaient à la fois plus de P-gp actives et de microdomaines que les isolats sensibles. Les résultats sont à confirmer dans les autres stades parasitaires. La compréhension de la résistance aux antiparasitaires chez les nématodes devrait contribuer à une meilleure maîtrise de la prophylaxie antiparasitaire.

Le transcriptome épидидymaire chez le ver rat : Etude de la régionalisation

Benoît Guyonnet (1,2), Jean-Louis Dacheux (1), Florence Jaffrézic (3), Anne Lacoste (2), Guillemette Marot (3), Marie-José Mercat (2), Sandrine Schwob (2), Jean-Luc Gatti (1)

(1) *UMR 6175 Inra-Cnrs-Université de Tours-Haras Nationaux, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 NOUZILLY, France*

(2) *IFIP, La Motte au Vicomte 35650 LE RHEU, France*

(3) *Unité de génétique quantitative et appliquée, INRA, 78352 JOUY EN JOSAS, France*

Chez les Mammifères, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant au sein de l'épididyme, organe constitué d'un tube pelotonné et relié au testicule par le canal efférent. L'épididyme est divisé en 3 régions morphologiques (tête, corps, queue) subdivisées en 10 zones. A l'aide d'une puce à ADN porcine (GEO : GPL3729), nous avons entrepris l'analyse du transcriptome épидидymaire chez 4 verrats Large White adultes, sélectionnés sur leur qualité de reproducteur. Pour chaque animal, nous avons hybridé les ADNc dérivés d'ARN extraits de 9 zones épидидymaires et du canal déférent. Les transcrits différentiellement exprimés entre les tissus étudiés ont été recherchés : au sein de l'épididyme, 1226 transcrits sont différentiels (FDR=0,0001). Les données obtenues ont été analysées selon deux méthodes statistiques non supervisées pour la recherche de classe : une méthode de partitionnement (PAM) et une méthode de classification hiérarchique (CAH et HCL). Seuls les gènes classés de la même manière par les deux types d'analyse ont été gardés pour les analyses fonctionnelles.

Cette approche permet :1) de montrer l'existence de 5 régions épидидymaires : la tête antérieure comprenant les zones 0-1, la tête médiane avec la zone 2, la tête postérieure avec les zones 3-4, le corps constitué des zones 4 à 7, le canal déférent qui se regroupe avec la zone 8/9 pour former la queue et, 2) de définir trois classes de gènes « robustes » avec des expressions préférentielles au niveau de certaines de ces régions.

Cette étude démontre l'existence d'une forte régionalisation de l'épididyme et a permis de caractériser les transcrits associés à celle-ci. Ce travail ouvre la possibilité de comparer les transcriptomes épидидymaires chez des animaux de fertilité et d'âges différents.

Ultra-high resolution top down Fourier-transform mass spectrometry experiments reveal microheterogeneity of human salivary proteins.)

Frederic Halgan¹, Sara Bassilian¹, Puneet Souda¹, Vlad Zabrouskov², Joseph A. Loo³, Kym F. Faull¹, David T. Wong⁴ Julian P. Whitelegge¹

¹The Pasarow Mass Spectrometry Laboratory, The Jane & Terry Semel Institute for Neuroscience University of California, Los Angeles., ² Thermo Electron, San Jose, Gaafornia, CA 95134.

³Department of Biological Chemistry, University of California, Los Angeles. ⁴ School of Dentistry, University Of California, Los Angeles.

Complementary to bottom-up approaches, top-down proteomics is being applied as a powerful method to provide complete characterization of protein primary structure of proteins. The strength of this method lies in its capacity to provide an unprejudiced description of genetic sequence polymorphism and post-translational modifications. Amongst ail types of proteomics studies, the analysis of biological fluids such as saliva offers particular advantages inciuding their availability and their non invasive collection. In our study this biological fluid is investigated as a potential source of disease biomarkers and therapeutic targets. To this view the description of protein isoforms, and intra- and inter- individual polymorphisms would provide a better understanding of structure/function relationships of proteins and the discovery of disease biomarkers.

Top down data obtained using FT-MS with high mass accuracy and resolution, in conjunction with multiple types of dissociation experiments, was shown to be extremely powerful for revealing subtle sequence changes. At least twenty proteins were identified and new sequences polymorphisms and post-translational modifications described. Strikingly, Peptide P-C data revealed the presence of three isoforms differing by ± 1 Da. Similarly protein II-2 isoforms was found to be a mixture of two isoforms only differing by 11 ppm. Other data revealed SNP's, new ORF's and new localizations of PTM' s. The conclusion of this study highlights the ultimate requirement for unprejudiced interpretation of tandem mass spectral data with the view to discover new biomarkers of human pathologies in saliva.

Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle

Labas V, Dacheux JL, Maurel MC, Teixeira AP, Canepa S, Cornu D.

Centre de Recherches INRA de Tours, F-37380 Nouzilly, France.

La Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle (PPAF) du Centre INRA de Tours offre un savoir-faire et un accès complet à un ensemble de technologies de pointe : électrophorèse, chromatographie, spectrométrie de masse, résonance plasmonique... Ouverte à la communauté scientifique publique et privée, son principal objectif est de fournir les meilleurs outils et stratégies en matière d'approches protéomiques pour l'étude de divers modèles animaux, végétaux ou microbiens utilisés dans le cadre de thématiques de recherche variées.

La Plate-forme PAF regroupe ainsi un ensemble d'experts spécialisés :

- en techniques séparatives électrophorétiques 1D-2D et chromatographique 2D pour la purification et la séparation des protéines et peptides.
- en spectrométrie de masse pour l'identification des protéines et la caractérisation de leurs modifications post-traductionnelles, pour la recherche de biomarqueurs à partir de cellules entières de type procaryotes ou eucaryotes.
- en résonance plasmonique de surface (Biacore) pour l'étude des interactions protéines-protéines, protéines-ligands ou autre.



http://www.tours.inra.fr/plates_formes_et_plateaux_techniques/plates_formes/ppaf

The design of GAG-based glyco-inhibitors of chemokine presentation.

Nathalie Lamerant-Fayel¹, Jean-Claude Jacquinet², Claire Crola da Silva¹, Katarzyna Mleczko^{1,3}, Pawel Kabala^{1,3}, Emilie Landry¹, Michèle Mitterrand¹ and Claudine Kieda¹.

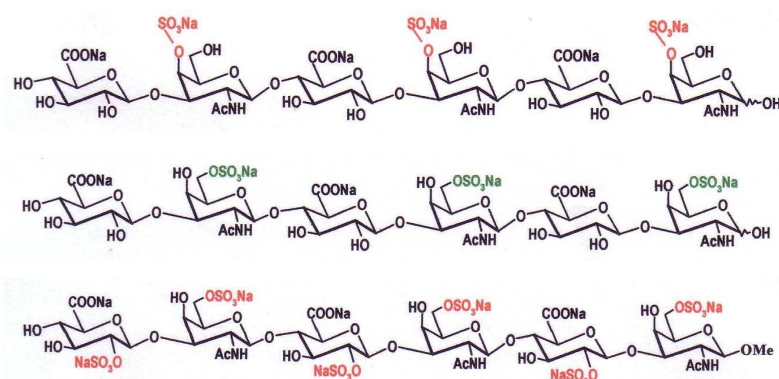
¹Centre de biophysique moléculaire, CNRS UPR 4301, rue Charles Sadron 45071 Orléans.

²ICOA, Université d'Orléans, UFR Sciences, rue de Chartres 45067 Orléans.

³IBBB, Université Jagellon, Ul. Gronostajowa 7, 37387, Cracovie, Pologne

The mechanism of chemokines presentation is highly significant for endothelial cell (EC) biology. Both in terms of chemo attractant gradient formation and stabilisation as well as selectivity of the EC in the organospecific and microenvironmental context, the chemokine activity in EC gets to be a clue for the design of new targeted drugs. Because ECs are the cell- and molecule- sorters of the body, the chemokines part in the adhesion/recognition pathway needs to be elucidated because of the degree of specificity they bring. Indeed, we have shown that EC are able to bind and present selected chemokines, in a glycosaminoglycans (GAGs)-dependent manner, thus allowing the chemoattraction to be exerted towards the integral membrane chemokines receptor bearing cells. This is particularly important in the malignant cell recruitment and invasion of site into which they metastasize. By finding the means to block the chemokines presentation it will be possible to reduce the attraction gradient efficiency and counteract the malignant cell invasion of a tissue (Kieda and Dus, 2003). We have studied: 1/ the binding of chemokines to endothelial cells and shown the selectivity of the resulting activation, 2/ the GAG repartition among organospecific Ecs, 3/ the GAGs specific binding of chemokines a) at the cellular level and b) at the direct *in vitro* interaction measured by surface plasmon resonance.

This allowed us to show that the CCL21 (6Ckine) is specific for peripheral lymph node microvascular endothelial cells, activates them, enhances their recruitment- and leukocyte- binding activity. Its mechanism of action is due to its binding to GAGs and particularly chondroitin sulfate E. We showed that its activity is efficiently inhibited by the synthetic hexasaccharides from the chondroitin sulfate D as compared to the A and C motives. A higher molecular weight, branching for a more efficient presentation and complementary sulfation are to be added to define highly active competitors.



ChSA Hexasaccharide

MW : 1528Da

ChSC Hexasaccharide

MW : 1528 Da

ChSD Hexasaccharide

MW : 1848 Da

Karst, N.; Jacquinet, J.-C. (2002) Eur. J. Org. Chem., 815-825. Kieda, C. and Dus, D. (2003) Adv Exp Med Biol, **535**, 79-94.

Nebulization of an antitumor antibody: example of cetuximab.

A MAILLET¹, N CONGY-JOLIVET², S LEGUELLEC³, L VECCELLIO¹, S HAMARD¹, H WATIER², P DIOT¹, G THIBAUT², Y COURTY¹, E LEMARIE¹, N HEUZE-VOURC'H¹

1. Université François-Rabelais de Tours, France, INSERM U618
2. Université François-Rabelais de Tours, France, EA 3853-IPGA
3. Atomisor, DTF, Saint Etienne, France

Inhalation is a very attractive and promising route to deliver drugs to lung tumours. Indeed, it may increase drugs antitumour responses by targeting lungs directly and reduce secondary organ toxicity. Although recombinant antitumour antibodies are efficient and exciting new therapeutics, they have never been tested in lung cancer treatment through airway conduction.

In this study, we evaluated effect of nebulization on cetuximab, an inhibitory anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) antibody, currently tested in non-small cell lung cancer (NSCLC) by IV injection. Cetuximab was nebulized with three different devices: a jet nebulizer, PARI LC+[®] (PARI, Germany), an ultrasonic nebulizer, SYST'AM[®] LS290 (SYST'AM, France) and a mesh nebulizer, AeronebPro[®] (Aerogen, USA). Cetuximab aerosols were characterized using optical microscopy and cascade impaction. Cetuximab cytotoxicity was measured by inhibition of cell growth and EGFR phosphorylation. EGFR recognition and affinity by cetuximab after nebulization was determined by flow cytometry. Nebulization of cetuximab by Pari LC+[®] and SYST'AM[®] LS290 resulted in aggregation formation and reduced pharmacological activity. AeronebPro[®] nebulizer maintained cetuximab integrity, immunological and cytotoxic properties.

Altogether our results showed that choice of inhaler device is crucial for antibody nebulization.

Human endothelial stem cells: isolation, differentiation and phenotypic characterization.

Maria Paprocka, Agnieszka Krawczenko, Elżbieta Wojdat, Jerzy Heimrath[#], Claudine Kieda*, Danuta Duś

Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław;
[#]Chair of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Wrocław, Poland; *Centre de
Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR 4301, Orléans, France.

Endothelial precursor cells isolated from umbilical cord blood, after transplantation could modulate postnatal neovascularization. As the number of endothelial precursors in a bone marrow and circulating blood is extremely low, the aim of the study was to determine the optimal conditions for selective growth of progenitor cells from umbilical cord blood for their future use.

Human CD34, CD133 positive cells were isolated from umbilical cord blood and cultured in the presence of stem cell growth factor (SCGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF)

Flow cytometry applied to phenotype analysis of proliferating cultures revealed that:

1. CD133 positive cells were able to acquire phenotype of endothelial cells when cultured in a presence of VEGF.

2. Early cultures contained high percentages of CD133, CD34, CD117, CD105 positive cells and the percentages declined with time during culture and differentiation.

3. Differentiated cells acquired gradually typical endothelial cell markers; vWf and VE cadherin and the ability to form pseudovessels when cultured in Matrigel.

Overall expansion of CD133 positive cells was substantial, reaching about 80 times. Time when progenitors were able to modulate postnatal neovascularization remains to be determined.

This work was supported by the State Committee for Scientific Research, Grant No. PBZ-KBN-083/P05/2002.

CAPACITE DE SOUTIEN DE L' L'HEMATOPOÏÈSE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE HUMAINE DIFFERENCIÉES DANS LA VOIE OSTEOBLASTIQUE

Tatiana Ribeiro¹, Alain Langonné^{1,2}, Bruno Delorme¹, Pierre Charbord¹, Jorge Domenech¹.
¹Laboratoire d'Hématopoïèse, INSERM-ESPRI/EA3855, Faculté de Médecine, Tours, France.
²EFS Centre Atlantique, Tours, France.

Les cellules stromales de la moelle osseuse (MO) sont indispensables à la régulation de la balance autorenouvellement/différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cette régulation, localisée au sein de la niche hématopoïétique, est assurée (au moins en partie) par une sous-population d'ostéoblastes immatures (Spindle-shaped N-cadherin⁺ Ostéoblasts). Une autre catégorie de cellules souches médullaires, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont à l'origine des cellules stromales et ont, en outre, la propriété de donner naissance aux tissus osseux, adipocytaire ou chondrocytaire. Le rôle des CSM dans la régulation de l'hématopoïèse n'est pas encore très bien connu. L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de soutien de l'hématopoïèse des CSM en fonction de leur degré de différenciation ostéoblastique. Les CSM ont été obtenues par culture en milieu α MEM (+SVF 10%+FGF2 1ng/ml). Elles ont été différenciées par culture dans les lignages ostéoblastique (NaH₂PO₄-Dexaméthazone-Acide ascorbique) et adipocytaire (IBMX-Indométhacine-Dexaméthazone). La différenciation ostéoblastique a été évaluée par western-blot sur l'expression de l'ostéocalcine (OCN), des récepteurs calcium sensible (CaS-R), à la PTH (PTH-R) et à la BMP (BMP-R₂). La capacité de soutien de l'hématopoïèse a été évaluée par co-culture avec des cellules médullaires CD34+ pendant 5 semaines en dilution limite [test des Cobblestone Area-Forming Cells (CAFC)]. Nous avons constaté que l'OCN, le PTH-R et le BMP-R₂ étaient déjà exprimés sur les CSM non différenciées. Après différenciation ostéoblastique (pendant 21 jours), l'expression de l'OCN et du PTH-R est restée constante, alors que celle du BMP-R₂ a diminué fortement à J5 et celle du CaS-R augmenté progressivement à partir de J14. Les fréquences des CAFC obtenues sur des CSM après 3j et 7j de différenciation osseuse étaient respectivement de 1 CAFC pour 39 et 33 cellules CD34+. Parallèlement, cette fréquence obtenue sur des CSM après 7j de différenciation adipocytaire était de 1 CAFC pour 41 cellules CD34+. En conclusion, plusieurs marqueurs ostéoblastiques sont exprimés sur les CSM avant toute différenciation et la capacité de soutien de l'hématopoïèse par des CSM différenciées dans la voie ostéoblastique semble plus importante que celles différenciées dans la voie adipocytaire.

Projet de constitution d'une plateforme de production et de cristallisation de protéine recombinante en région Centre.

Alain Roussel, CBM, Orléans

Le Groupement d'intérêt scientifique « Génomique fonctionnelle et Structure des protéines appliquées à la Signalisation et à la Transcription » (GSST) a favorisé l'élaboration des plusieurs projets pluridisciplinaires (9 sont actuellement lancés) entre équipes de sites et d'organismes différents, éloignées de par leurs culture scientifique mais faisant toutes parties de la région Centre. La plupart de ces projets son basés sur la mise en oeuvre de techniques d'études au niveau physiologique, génétique et moléculaire.

L'étude des macromolécules biologiques, comme les protéines, au niveau moléculaire et structural nécessite des quantités très importantes de protéines pures. Mais l'obtention des protéines purifiées et des cristaux de qualité constitue encore un facteur limitant. La production de protéines recombinantes requiert plusieurs étapes. A) Insertion du gène d'intérêt dans une construction permettant sa surexpression. B) Réalisation de tests d'expression de la protéine et localisation de la protéine dans la fraction soluble et/ou insoluble de l'extrait brut après lyse des cellules. C) Passage à grande échelle. D) Purification de la protéine grâce à une colonne d'affinité spécifique d'une étiquette présente au début ou à la fin de la chaîne protéique. D1) Si la protéine est insoluble (mauvais repliement), elle servira à préparer des anticorps fort utiles pour étudier la localisation et le métabolisme de la protéine *in vivo*. D2) Si la protéine est soluble, elle servira à effectuer des essais de cristallisation.

La plupart des étapes peuvent être automatisées ce qui permet d'envisager la constitution d'une plateforme pouvant prendre en charge de nombreuses productions. Cette plateforme sera constituée d'un robot pipeteur/manipulateur permettant de réaliser les étapes de clonage, les tests d'expressions et leurs analyses (étapes A et B), et d'un robot de cristallisation permettant de tester des conditions sur des échantillons de 100 à 300 nanolitres. En coordination avec les plateformes de protéomique (INRA – Nouzilly) et de transcriptomique (INRA - Ardon), l'automatisation de la plateforme « protéines » du CBM (CNRS – Orléans) permettra de lier efficacement les études génétiques, physiologiques et d'interactions moléculaires et de valoriser en Sciences du vivant, la participation de la région Centre au laboratoire SOLEIL

Régulation par le monoxyde d'azote (NO[•]) de la reconnaissance cellulaire lors de l'angiogénèse tumorale : Comparaison de lignées endothéliales organo-spécifiques

Aude Sélo, Claudine Kieda, Catherine Grillon
*Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS
Rue Charles Sadron, 45071 ORLEANS cedex02*

L'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire pré-existant. L'angiogénèse tumorale est nécessaire à la croissance des tumeurs, ainsi qu'à leur dissémination vers d'autres organes. Elle fait intervenir une reconnaissance cellulaire spécifique des cellules endothéliales entre elles et avec leur matrice, dans le but de former une structure vasculaire fonctionnelle en direction de la tumeur. Le monoxyde d'azote (NO[•]) est fortement impliqué dans ce phénomène.

Notre travail consiste à étudier le(s) rôle(s) du NO[•] dans la reconnaissance cellulaire impliquant les cellules endothéliales et plus particulièrement dans l'angiogénèse. Nous étudions les modifications des interactions cellules-cellules, en utilisant comme modèle des cellules endothéliales spécifiques de plusieurs organes (peau, cerveau, poumons, ganglions lymphatiques) isolées et immortalisées au laboratoire.

La formation de l'angiogénèse sur Matrigel[®] par les cellules endothéliales de peau est inhibée par 100µM de DPTA-NONOate (donneur de NO[•] d'une ½ vie de 3h à 37°C) à partir de 24h. Par contre, le DETA-NONOate (donneur de NO[•] d'une ½ vie de 20h) est inactif.

Nous avons vérifié par utilisation de l'iodure de propidium et de l'Annexin V-FITC que cette inhibition de l'angiogénèse par le DPTA-NONOate n'est pas le résultat d'un effet cytotoxique ou pro-apoptotique de cette molécule.

Nous avons donc recherché une modulation de l'expression des molécules d'adhésion, qui sont indispensables à l'angiogénèse, à la surface des cellules endothéliales par le DPTA-NONOate. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les principales molécules d'adhésion des cellules endothéliales de peau par cytométrie en flux dans des conditions normales (normoxie : 21% d'oxygène) ou pro-angiogénique (hypoxie : <1% d'oxygène). Dans les 2 cas, nous observons la présence de PECAM-1 (CD31), CD34, ICAM-1 (CD54) et HCAM (CD44) avec peu de différence d'expression entre normoxie et hypoxie.

Dans un second temps, nous comparerons les expressions des molécules d'adhésion en présence de donneurs de NO[•], puis sur des cellules endothéliales d'origine tissulaire différente. Notre but est de mieux définir l'effet du NO[•] sur l'angiogénèse, pour les différentes lignées endothéliales, afin d'en dégager un intérêt thérapeutique.

EXPRESSION DES ONCOMARQUEURS DANS LES CELLULES GERMINALES ET EMBRYONS PRECOCES BOVINS: AURORA KINASES ET LEUR IMPLICATION POSSIBLE DANS LA MATURATION OVOCYTAIRE.

Svetlana Uzbekova^{§ 1}, Rozenn Dalbies-Tran¹, Pascal Mermillod¹, Claude Prigent², Rustem Uzbekov¹.

¹ Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours/Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France.

² CNRS UMR6061 Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement 35043 Rennes, France.

Les Aurora serine-thréonine kinases sont des régulateurs clés de la mitose et sont impliquées dans la ségrégation correcte des chromosomes et la cytokinèse. Les Aurora kinases s'expriment dans les cellules en division et sont localisées sur les centrosomes, chromosomes et midbody. La surexpression des Aurora kinases actives est liée à la tumorigénèse.

Les ARN messagers d'Aurora A, B et C sont surexprimés dans l'ovaire et le testicule bovin par rapport aux autres tissus somatiques. Les Aurora protéines sont détectées dans l'ovocyte et le testicule. Les profils d'expression ARN et protéines d'Aurora A, B et C dans l'ovocyte sont différents au cours de sa croissance, lors de la maturation *in vitro* (MIV) et du développement embryonnaire précoce. Aurora A et C ARNm sont stables durant la MIV, mais diminuent fortement au stade morula et blastocyste, tandis que Aurora B réinitialise son expression après l'activation du génome embryonnaire. Aurora A est la forme la plus abondante dans l'ovocyte; la protéine est accumulée progressivement dans cytoplasme au cours de la croissance folliculaire et la MIV. Aurora B est associée aux chromosomes de l'ovocyte en métaphase I/II de la méiose. Aurora C est très peu exprimée dans l'ovocyte. Les trois kinases Aurora, y compris Aurora A active, ont été détectées concentrées sur l'anneau contractile / "midbody" entre l'ovocyte mature et la première globule polaire. L'administration durant la MIV de VX680, l'inhibiteur spécifique de l'activité kinase d'Aurora, génère des ovocytes multinucléaires par des divisions méiotiques anormales sans expulsion du globule polaire. Les résultats suggèrent que les oncogènes de la famille d'Aurora kinases sont impliqués dans la méiose chez le bovin.

Régulation de l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine extracellulaires par le peroxyde d'hydrogène : rôle protecteur de la catalase

F. Veillard, V. Hervé-Grépinet, E. Godat, F. Lecaille et G. Lalmanach (contributions égales des deux premiers auteurs) *Inserm U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires », IFR 135, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours cedex, France. Tel: + (33) 2 47 36 61 51, courriel: gilles.lalmanach@univ-tours.fr*

Les cathepsines à cystéine (CPs) sont inactivées *in vitro* de façon dose-dépendante en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (1). Néanmoins, ces enzymes sont retrouvées actives dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de patients atteints d'inflammations pulmonaires aiguës ou chroniques, malgré le stress oxydatif qui accompagne ces phénomènes inflammatoires (2-4).

Après avoir démontré par des techniques immunochimiques et enzymatiques la sécrétion de CPs actives, ainsi que de catalase, par les cellules THP-1 différenciées en macrophages, nous avons montré que l'addition d'H₂O₂ ne diminuait pas l'activité protéolytique des CPs extracellulaires. Nos résultats suggèrent que le maintien de l'activité des CPs durant le stress oxydatif pourrait s'expliquer en partie par la sécrétion en quantité suffisante de catalase par les macrophages alvéolaires recrutés sur les sites d'inflammation.

(1) E. Godat, V. Hervé-Grépinet, F. Veillard, F. Lecaille, M. Belghazi, D. Brömme et G. Lalmanach. Regulation of extracellular cysteine cathepsins activity by hydrogen peroxide. *Manuscript en préparation*.

(2) C. Serveau-Avesque, M. Ferrer-Di Martino, V. Hervé-Grépinet, E. Hazouard, F. Gauthier, E. Diot et G. Lalmanach (2006). Active cathepsins B, H, K, L and S in inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol. Cell* 98, 15-22.

(3) C. Perdereau, E. Godat, M.C. Maurel, E. Hazouard, E. Diot et G. Lalmanach (2006). Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. *Bioch. Biophys. Acta* 1762, 351-356.

(4) G. Lalmanach, E. Diot, E. Godat, F. Lecaille et V. Hervé-Grépinet (2006). Cysteine cathepsins and caspases in silicosis. *Biol. Chem.* 387, 863-870

BASES MOLECULAIRES DE LA MODULATION DE LA REPONSE FSH et LH DE LA eCG INDUITE PAR DES ANTICORPS ANTI-eCG POTENTIALISANTS

WEHBI Vanessa, DECOURTYE Jérémy, DURAND Guillaume; REITER Eric, MAUREL Marie-Christine
I.N.R.A., P.R.C., UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours/Haras Nationaux, 37380 Nouzilly

Dans les élevages ovins et caprins, la choriogonadotropine équine (eCG) est utilisée pour induire l'ovulation à contre-saison. Chez certaines femelles, son utilisation répétée entraîne une diminution d'efficacité due à la sécrétion d'anticorps (Ac) anti-eCG. Dans certains cas, ces Ac améliorent l'efficacité du traitement, avec un taux de mise bas systématique de 100% après insémination artificielle, quelque soit le nombre de traitements reçus. Nous avons montré que ces femelles sécrètent des Ac anti-eCG à effet potentialisant sur les bioactivités LH et FSH de la eCG (Hervé *et al.*, 2004). L'Ac a un effet potentialisant uniquement lorsqu'il est complexé à la eCG. Un des objectifs de notre étude est d'analyser l'impact de ce nouvel agoniste, eCG/Ac potentialisant (Ac+), sur les voies de signalisation en comparant le cas d'une stimulation par la eCG seule ou complexée à l'Ac potentialisant.

Nos travaux visent donc à étudier si l'efficacité des voies $G\alpha_s$ / PKA-dépendantes d'une part et β -arrestines-dépendantes d'autre part, peut être spécifiquement modulée par le complexe eCG/Ac+ par rapport à une stimulation par la eCG seule. Pour cela, nous étudions l'impact du complexe sur la phosphorylation des ERKs, système activable par les 2 voies et sur la production d'AMPC, un indicateur spécifique de la voie protéine G. Les résultats montrent que si l'effet potentialisant du complexe est retrouvé systématiquement sur la phosphorylation des ERKs, il n'en est pas de même pour la production d'AMPC. Il semblerait que la complexation de l'hormone avec certains anticorps puissent conduire à moduler sélectivement les voies de signalisation. L'utilisation d'outils pharmacologiques et de siRNA devrait nous permettre de confirmer cette hypothèse en disséquant de manière plus fine les voies de signalisations impliquées pour chaque complexe.

CONFERENCES

C1 – Mécanismes moléculaires et biomarqueurs associés aux vasculopathies induites par les inhibiteurs de phosphodiesterase 4 chez les rongeurs <i>Stéphan Chevalier</i>	34
C2 – La base de données de séquences de protéine UniProtKB/Swiss-Prot : visite guidée <i>Anne Esctreicher</i>	35
C3 – NANOTECHNOLOGIES : des sciences de l’information aux sciences du vivant <i>Jean-Marc Grognet</i>	36
C4 – Remodelage de la matrice extracellulaire dans les cancers <i>Nathalie Heuzé-Vourc’h</i>	37
C5 – Glycosylation et humanisation des biomédicaments <i>Friedrich Piller</i>	38
C6 – Nouvelles voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G <i>Eric Reiter</i>	39
C7 – Approche métabolomique dans l’industrie pharmaceutique : définition et exemple <i>Bernard Walther</i>	40

Mécanismes moléculaires et biomarqueurs associés aux vasculopathies induites par les inhibiteurs de phosphodiesterase 4 chez les rongeurs

Stephan Chevalier, Directeur du laboratoire de toxicologie cellulaire et moléculaire, Pfizer R&D, Amboise (stephan.chevalier@pfizer.com, Tél : 06 30 65 77 57).

Les phosphodiesterases (PDEs) sont des enzymes catabolisant les nucléotides cycliques libres tels que l'AMPC et le GMPc en métabolites inactifs. Les inhibiteurs de PDE4 présentent un intérêt thérapeutique dans des pathologies à composante inflammatoire telles que l'asthme ou les bronchopneumopathies chroniques obstructives. Cependant le développement pharmaceutique de ces molécules peut être entravé par l'apparition chez l'animal de laboratoire d'effets secondaires, dont l'origine demeure à ce jour mal connue, mais qui sont caractérisés par une inflammation et une altération de la paroi de certains vaisseaux. Afin de mieux comprendre l'étiologie de ces lésions et d'appréhender leur survenue possible chez l'homme, nous avons étudié les effets du CI-1044, un inhibiteur sélectif des PDE4 chez l'animal de laboratoire. Nous avons analysé le transcriptome de tissus mésentériques de rats traités par l'inhibiteur de PDE4 CI-1044 pendant 2 à 78 heures. Les profils d'expression génique des animaux traités, par rapport aux animaux ayant reçu le véhicule, ont été comparés et vérifiés par RT-PCR en temps réel (Taqman). Les résultats ont montré que la détection histopathologique de lésions inflammatoires et/ou nécrotiques observées dès 24 heures après le traitement correspond à une modification globale du profil d'expression génique dans les échantillons de tissu mésentérique des animaux traités. Un quart des gènes surexprimés chez les animaux présentant de l'inflammation et/ou de la nécrose est impliqué dans la réponse inflammatoire ou la réponse au stress oxydant et environ 40% des gènes sous-exprimés sont impliqués dans le métabolisme énergétique. Cette corrélation entre l'analyse histopathologique et l'analyse du transcriptome était également observable dans une analyse statistique en composantes principales du métabolome.

De plus, le processus inflammatoire est détectable dans le sang avant l'apparition des lésions vasculaires soit dès 8 heures de traitement et les modifications d'expression génique sont détectables dès 2 heures après l'administration du CI-1044. Ainsi, des gènes codant pour des protéines inflammatoires telles que l'interleukine 6 ou les protéines MRP8 et MRP14 (migration inhibitor factor related proteins) sont activés au temps 2 heures. La réponse à un stress oxydant en amont de la détection histologique des lésions est illustrée par l'augmentation de l'expression, après 4 heures de traitement, des gènes codant pour l'enzyme pro-oxidante xanthine déhydrogenase et l'enzyme anti-oxidante superoxide dismutase 2. La combinaison d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydatif, l'un amplifiant l'autre via la libération de différents médiateurs, joue probablement un rôle important dans la sévérité des lésions inflammatoires conduisant à la nécrose de la paroi vasculaire. Enfin, l'augmentation significative de l'expression de TIMP-1, un inhibiteur tissulaire des metalloprotéinases, à la fois au niveau génique et protéique dès 4 heures après l'administration du CI-1044 en fait un biomarqueur prédictif potentiel des vascularites induites par des substances de la classe des inhibiteurs de phosphodiesterase 4. Afin de vérifier la possibilité de transposer le dosage de TIMP-1 des études pré-cliniques aux études cliniques, il est important de mesurer son expression dans le plasma des chiens et des singes mais également de patients atteints de vascularites, en particulier de vascularites médicamenteuses, en vérifiant en parallèle si le médicament ciblé induit une toxicité vasculaire chez l'animal de laboratoire.

La base de données de séquences de protéine UniProtKB/Swiss-Prot : visite guidée

Anne Estreicher, Amos Bairoch, Lydie Bougueleret et environ 80 collaborateurs

Institut Suisse de Bioinformatique, Groupe Swiss-Prot, Centre médical universitaire,
1, rue Michel-Servet, CH-1211 Genève 4

Les sciences de la vie sont confrontées à un afflux massif de données issues notamment des projets de séquençage. Ces informations, cruciales pour notre compréhension du vivant, doivent être analysées, intégrées et mises à la disposition de la communauté scientifique. C'est dans ce contexte que s'inscrit la base de données de séquences de protéines UniProtKB/Swiss-Prot. Ses caractéristiques sont les suivantes :

1. annotation manuelle de haute qualité ;
2. redondance minimale ;
3. degré élevé d'intégration avec les autres bases de données (références croisées).

Pour éviter la multiplication d'entrées correspondant aux produits d'un même gène dans une espèce donnée, les différentes séquences d'une protéine (isoformes générées par épissage alternatif et variants physiopathologiques ou artefactuels), sont regroupées, dans la mesure du possible, dans une seule entrée UniProtKB/Swiss-Prot. Chaque séquence est contrôlée et les différences entre les séquences sont répertoriées. La séquence la plus représentative - ou la plus probable - est analysée grâce à des outils bioinformatiques performants et décrite dans l'entrée résidu par résidu en fonction des résultats de ces prédictions et des données expérimentales rapportées dans la littérature. De plus, un état des lieux des connaissances actuelles sur la protéine en question, telles que sa fonction, sa localisation subcellulaire, sa structure, ses similarités à d'autres protéines, etc., est fourni dans l'entrée. Une importance particulière est accordée à la description des modifications post-traductionnelles, aux isoformes produites par épissage alternatif, ainsi qu'aux polymorphismes et mutations impliquées dans diverses pathologies. Ces données proviennent de la littérature scientifique, de communications personnelles, et d'analyses bioinformatiques des séquences. Pour compléter les informations d'intérêt général fournies par la base de données, UniProtKB/Swiss-Prot offre des liens explicites vers 90 autres ressources externes : bases de données de séquences nucléotidiques, génomiques, protéomiques (2D-PAGE), de structure tridimensionnelle ou autres bases de données spécialisées.

Depuis 2002, le groupe Swiss-Prot fait partie du consortium UniProt et la base de données UniProtKB/Swiss-Prot sera bientôt disponible sur le nouveau site UniProt avec une nouvelle mise en page, un nouveau moteur de recherches et de nouvelles options. Une version test existe déjà sur la toile à l'adresse <http://beta.uniprot.org/>.

En date du 11 septembre 2007, UniProtKB/Swiss-Prot comptait 283'454 entrées, représentant 11'031 espèces différentes (dont les plus représentées sont l'humain, la souris, la levure et le rat), 487'649 publications et 3'980'814 références croisées.

NANOTECHNOLOGIES : des sciences de l'information aux sciences du vivant

Jean-Marc GROGNET

**Directeur Scientifique, Direction de la Recherche Technologique
Commissariat à l'Energie Atomique**

Les microtechnologies et les nanotechnologies ont bouleversé les technologies de l'information et de la communication. Nos ordinateurs ont vu et voient leur puissance doubler tous les 18 mois environ. Ceci a été rendu possible par l'extrême miniaturisation des dispositifs électroniques et par la réduction de taille des transistors qui les composent. En 1950, un transistor était un composant de taille centimétrique aujourd'hui un transistor occupe un espace qui se mesure en dizaines de nanomètres (1 nanomètre = un milliardième de mètre). Une réelle révolution s'est déroulée sous nos yeux au cours des 25 dernières années. Notre expérience quotidienne nous montre et nous démontre ce fait. Parfois même nous ignorons la quantité de puces électroniques qui équipent le moindre de nos objets les plus familiers tel un lave vaisselle ou un réveil. Ces technologies impliquent d'être capable de travailler la matière à un niveau de résolution variant du micromètre (10⁻⁶m ou le millionième de mètre) au nanomètre (10⁻⁹ m ou le milliardième de mètre) (figure 1). Cette échelle est également celle à laquelle opère le vivant. Nos vaisseaux sanguins, nos bronches sont des capillaires de quelques µm transportant des fluides ou des gaz. Les cellules unités fonctionnelles de quelques µm de diamètre réalisent des réactions chimiques au sein de compartiments de quelques nanolitres. Le passage à l'intérieur des cellules de composés (médicaments, médiateurs chimiques, métabolites, etc.) se fait par l'action de pores de quelques nanomètres de taille. Notre défense contre les agressions extérieures se fait au moyen d'anticorps, protéines d'une taille proche de quelques dizaines de nm. Les agresseurs (bactéries, virus) sont également des entités de la taille micro voire nanométrique. S'intéressant à des objets de taille identiques, il était donc naturel que les nanotechnologies rencontrent les sciences biologiques. Cette convergence a été baptisée : La **nano – biotechnologie**.

La **nano - biotechnologie** se situe à la convergence des nano -sciences et de la biologie. Elle tire profit des méthodes de miniaturisation et de fabrication collective développées pour les micro et nano -technologies afin de réaliser de nouveaux outils d'étude du vivant. Ces nouveaux outils permettent de multiplier de façon extraordinaire le nombre d'analyse possibles sur un simple échantillon biologique, de manipuler des volumes d'échantillons excessivement faibles, de travailler sur une cellule isolée voire sur une molécule unique. Ces outils seront dans un avenir proche des éléments clefs pour repousser les limites de notre connaissance du vivant

De façon simple, on peut donc envisager que l'apport des nano-technologies se fera selon trois axes : **mieux voir c'est- à dire mieux diagnostiquer, mieux soigner et mieux compenser les déficits**.

C'est déjà une discipline académique très vivante qui commence à connaître les prémises d'un développement industriel.

Références :

GROGNET JM Les NanoBioTechnologies Annales des Mines- Réalités industrielles- (2004), **02**, 59-63
BOTTERO JY, GROGNET JM et LAURENT Les nanotechnologies : promesses et débats 10⁻⁹ Les Techniques de l'Ingénieur (2006) 3, 4-14

Sites www à consulter

CEA : www.cea.fr,

Union Européenne : <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/>

CNRS : <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/>,

<http://www.cnrs.fr/fr/presentation/ethique/comets/index.htm>

C4

Remodelage de la matrice extracellulaire dans les cancers

Nathalie Heuzé-Vourc'h, CR2 INSERM

INSERM U618, équipe 3 - « Aérosols et Cancer Broncho-pulmonaire » Tours

Contrairement aux idées longtemps défendues, la matrice extracellulaire n'est pas un support cellulaire passif. Elle constitue un réservoir de signaux qui modulent le fonctionnement des cellules et régulent la progression tumorale. Son remodelage qui intervient dans différentes conditions pathologiques, libère des facteurs de croissance et démasque des sites cryptiques au sein des protéines de soutien (collagène, vitronectine, laminine...), nommés matricryptines ou matricryptopes. L'exposition de ces motifs cryptiques est la conséquence d'un changement de conformation de la molécule parente, suite notamment à l'action de protéases produites par les cellules tumorales elles-mêmes ou les cellules du microenvironnement (fibroblastes, cellules inflammatoires...). Dans l'environnement pulmonaire, plusieurs catégories d'endoprotéases peuvent générer des matricryptines/matricryptopes. Premièrement, les métalloprotéases (MMPs) qui sont bien connues pour cliver de nombreuses protéines de soutien et participer au remodelage des MEC de l'organisme. Deuxièmement des protéases à cystéine, comme la cathépsine B ou K. Et, enfin des protéases à sérine comme l'élastase leucocytaire (HLE), la cathépsine G (Cat G) et la protéinase 3 (PR3) sécrétées par les cellules hématopoïétiques, mais aussi potentiellement une nouvelle famille de protéases à sérine, les kallicroïnes tissulaires humaines qui sont sécrétées par les cellules tumorales.

Le démasquage de matricryptines/matricryptopes permet leurs interactions avec des récepteurs membranaires qui activent ou inhibent des voies de signalisation impliquées dans la progression et la dissémination tumorale. En particulier, des travaux ont montré que ces motifs cryptiques peuvent favoriser la migration des cellules cancéreuses et l'angiogénèse.

Comme ces sites ne sont pas exposés ou présents dans la protéine de soutien native, ils constituent de nouveaux déterminants antigéniques qui peuvent être ciblés par des anticorps. Récemment, il a été démontré que des matricryptines/matricryptopes issus de la vitronectine ou du collagène IV sont détectés spécifiquement dans certaines tumeurs alors qu'ils sont inexistantes dans le tissu sain. Ces motifs pourraient donc constituer de nouveaux biomarqueurs et des cibles thérapeutiques potentielles pour des anticorps armés.

Glycosylation et humanisation des biomédicaments.

Friedrich PILLER

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301 affiliated to INSERM and the Université d'Orléans, Orléans

Les biomédicaments sont des médicaments produits par génie génétique et destinés à une administration systémique chez les malades. La plupart de ces biomédicaments sont des protéines naturellement secrétées et comme la majorité des protéines secrétées, elles empruntent la voie de sécrétion classique de la cellule. Tout au long de cette voie, ces protéines acquièrent des modifications post-traductionnelles nécessaires à leur activité et leur stabilité dans le milieu extracellulaire. La glycosylation est une des modifications post-traductionnelles les plus répandues. Les glycoprotéines humaines sont glycosylées par une panoplie de *N*- et *O*- glycanes prodigieusement hétérogènes. La glycosylation est le résultat de l'activité coordonnée d'une grande variété de glycosyltransférases, enzymes localisées tout au long de la voie de sécrétion depuis le réticulum endoplasmique jusqu'au réseau transgolgien. La glycosylation est un processus finement régulé qui change au cours du développement et de la différenciation, en fonction des conditions physiologiques et dans certaines maladies.

La glycosylation des biomédicaments produits dans les organismes comme les bactéries, les levures, les cellules d'insectes, de plantes et de mammifères autres que les humains est souvent différente de celle qu'on trouve chez l'homme. Cependant pour la plupart des biomédicaments, la glycosylation influence profondément l'activité biologique, la fonction, la demi-vie dans la circulation et l'antigénicité. Il est donc impératif, pour l'obtention d'une pharmacocinétique optimale des biomédicaments, que leur glycosylation soit aussi proche que possible de la glycosylation rencontrée chez l'homme.

Pour atteindre cet objectif, un grand nombre de stratégies ont été développées qui prennent en compte les potentiels de glycosylation des divers organismes hôtes. L'« humanisation » de la glycosylation nécessite souvent non seulement l'expression de glycosyltransférases adéquates dans l'hôte mais aussi des modifications de la glycosylation endogène rencontrée dans cet hôte. Dans beaucoup de cas une voie métabolique nouvelle doit être introduite qui conduit à la synthèse de nouveaux monosaccharides ainsi qu'à la formation des nucléotides-sucres correspondants puisque ces derniers sont les substrats des glycosyltransférases. Malgré la grande complexité du problème et les grandes difficultés souvent rencontrées, plusieurs stratégies ont conduit récemment à la production de biomédicaments dits « à glycanes humanisés » qui se sont révélés tout-à-fait actifs chez l'homme.

Hamilton, S. R. *et al* (2006) *Science* 313, 1441-3 ; Cox, K. M., *et al* (2006) *Nat Biotechnol* 24, 1591-7 ; Schahs, M., *et al* (2007) *Plant Biotechnol J* 5, 657-63

C6

Nouvelles voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

Eric REITER

UMR 6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, centre INRA de Tours, 37380, Nouzilly. reiter@tours.inra.fr

Les récepteurs à 7 passages transmembranaires (R7TM) couplés aux protéines G constituent une famille de protéines membranaires capables de lier une grande variété de ligands régulant ainsi l'ensemble des fonctions physiologiques. De plus, les R7TMs sont la cible de plus de 50% des agents thérapeutiques actuellement utilisés.

Le cadre conceptuel sur lequel la pharmacologie des R7TMs a été construite est en train d'évoluer, ouvrant des perspectives prometteuses pour le développement d'agents thérapeutiques nouveaux. Classiquement, la fonction des R7TMs est médiée et modulée par deux mécanismes génériques : l'activité des protéines G hétérotrimériques et la fonction des β -arrestines. L'activation des R7TMs déclenche la génération de seconds messagers diffusibles et stimule le recrutement de kinases spécifiques des R7TMs - les GRKs - qui les phosphorylent en retour. Les β -arrestines sont alors recrutées aux récepteurs phosphorylés et induisent leur désensibilisation par encombrement stérique. Les β -arrestines connectent également les R7TM à la machinerie d'endocytose par les vésicules à clathrine nécessaires à leur internalisation.

Il est apparu récemment que les R7TMs sont également capables d'activer des voies de signalisation intracellulaires indépendamment des protéines G. Le mécanisme qui semble le plus général fait également intervenir les β -arrestines. Ces dernières sont en effet capables de recruter des complexes signalétiques aux récepteurs activés. Il a par exemple été montré que les β -arrestines induisent l'activation des MAP kinases ERK selon une cinétique et avec une localisation subcellulaire distincte de celles activées par le mécanisme dépendant des protéines G. L'idée émerge maintenant que ce mécanisme de signalisation dépendant des seules β -arrestines médie des réponses biologiques distinctes de celles transduites par les protéines G.

Jusqu'ici, il était admis que toutes les réponses biologiques induites par un R7TM étaient corrélées. Par conséquent, n'importe quel essai fonctionnel permettait de caractériser complètement l'efficacité d'un ligand pour un R7TM donné, le classifiant comme agoniste complet, partiel ou inverse. Cependant, des ligands « biaisés », capables d'activer ou d'inactiver sélectivement certaines voies de signalisation sont maintenant décrits. Ces données conduisent à un nouveau paradigme qui ouvre des opportunités fascinantes pour le développement d'agents thérapeutiques sélectifs.

Dans mon exposé, j'illustrerai ces concepts en m'appuyant sur les travaux réalisés dans notre équipe sur le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et je présenterai les perspectives qui s'ouvrent à nous pour développer une nouvelle pharmacologie des hormones gonadotropes.

"Approche métabolomique dans l'industrie pharmaceutique : définition et exemple"

B. WALTHER - Directeur du centre de Pharmacocinétique et de Métabolisme
Technologie Servier -ORLEANS

L'émergence et le développement des différentes approches globales de systèmes biologiques (génomique, transcriptomique, protéomique, métabonomique / métabolomique, ...) peuvent être considérés comme une véritable révolution dans le domaine de la recherche pharmaceutique, de part la richesse et l'impact potentiel des informations générées par chacune de ces disciplines.

En dehors des progrès techniques qui seront présentés, les véritables défis d'aujourd'hui sont d'interpréter la multiplicité des données générées et d'interconnecter ces disciplines afin de créer un faisceau de connaissances utilisables pour la découverte et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs utilisables chez l'homme.

La métabonomique, peut être considérée comme un formidable outil de "biochimie clinique" capable de photographier les désordres métaboliques chez un individu ou un organisme cellulaire suite à un traitement ou au cours de l'installation ou de l'évolution d'une pathologie.

C'est pourquoi, elle a parfaitement trouvé sa place dans le domaine de la recherche préclinique, phase importante du développement d'une nouvelle molécule, permettant d'obtenir précocement des informations sur le médicament (cinétique), son élimination (métabolisme de la molécule) et son impact sur le métabolisme endogène de l'organisme.

La métabonomique sera présentée comme un outil de sélection supplémentaire pour la caractérisation de modèles et de profils pharmacologique (efficacité), de toxicité et d'activité de nos futurs médicaments.

Ainciburu, 4
André, 19
Asseline, 11
Aubert, 11
Aucagne, 5, 7
Bahut, 4
Baranger, 6
Barbaroux, 8
Barta, 7
Bassilian, 22
Bhattacharyya, 18
Bonhomme, 8
Bourassa, 14
Bourgerie, 9
Brignolas, 8
Cadoret, 17
Canépa, 10, 23
Chandenier, 6
Charbord, 27
Chassignol, 11
Chevalier, 34
Cochet, 12
Coco, 4
Combelas, 13
Congy-Jolivet, 25
Cornu, 14, 23
Courty, 4, 25
Coursaget, 13
Crola da Silva, 19, 24
Dabboue, 18
Dacheux JL., 12, 14, 21, 23
Dalbies, 17
Dalbies-Tran, 30
Dallet-Choisy, 6
Decourtye, 32
Décoville, 15
Delmas, 5, 7
Delorme, 27
Diot, 25
Domenech, 27
Dreyer, 8
Drouet, 16
Durand, 32
Dus, 26
El Hmouzi, 16
Ernault, 4
Escreicher, 35
Faull, 11
Faure, 14
Feuerstein, 17
Fisichella, 18
Fleury, 13
Franchi, 19
Garnier, 20
Gatti, 21
Godat, 31
Grillon, 29
Grognet, 36
Guégnard, 20
Guérif, 17
Guerin, 18
Guette, 4
Guyonnet, 21
Halgand, 22
Hamard, 25
Heimrath, 26
Hervé-Grépinet, 31
Heuzé-Vourc'h, 4, 25, 37
Hevor, 18
Jacquinet, 24
Jaffrézic, 21
Kabala, 24
Kerboeuf, 20
Kieda, 19, 24, 26, 29
Koch, 20
Krawczenko, 26
Labas, 12, 14, 23
Lacoste, 21
Lacroix-Lamandé, 16
Lalmanach, 31
Lamerant-Fayel, 24
Lamiable, 15
Landry, 24
Langonné, 27
Laurent, 16
Le Vern, 16, 20
Lecaille, 31
Leguellec, 25
Lelièvre, 7
Lemarie, 25
Lemoine, 16
Locker, 15
Loo, 22
Lorthiois, 4
Maillet, 25
Marceau, 7
Marot, 21
Marteau, 19
Maurel, 10, 23, 32
Mercat, 21
Mermillod, 30
Mitterand, 19, 24
Mleczo, 24
Monclus, 8
Morabito, 8
Moreau, 6
Paprocka, 26
Piller F., 9, 38
Piller V., 9
Poirier, 14
Prigent, 30
Rabhi, 15
Reiter, 32, 39
Ribeiro, 27
Riou, 20
Roig, 11
Roussel, 28
Royère, 17
Salvetat, 18
Schwob, 21
Sélo, 29
Souda, 22
Teixeira, 23
Thibault, 25
Touzé, 13
Uzbekova, 30
Valverde, 5
Vecellio, 25
Veillard, 31
Villar, 8
Walther, 40
Watier, 25
Wehbi, 32
Whitelegge, 22
Wojdat, 26
Wong, 22
Zabrouskov, 22
Zani, 6