



LES BIOSCIENCES
EN REGION CENTRE

ACTES

du

21^e Colloque

BIOTECHNOCENTRE

23 - 24 Octobre 2008

Seillac (Loir et Cher)

Avec le concours du Conseil Régional du Centre



Région Centre

Christian ANDRES, Université de Tours, Inserm316@med.univ-tours.fr - **Marc BERTRAND**, Technologie Servier, marc.bertrand@fr.netgrs.com - **Christian BRETON**, UAGPF INRA Orléans, christian.breton@orleans.inra.fr - **Stephan CHEVALIER**, Centre de Recherche Pfizer, stephan.chevalier@pfizer.com - **Jean-Louis DACHEUX**, UMR INRA CNRS NOUZILLY, jdacheux@tours.inra.fr - **Daniel LOCKER**, CBM CNRS Orléans, locker@cnrs-orleans.fr - **Marie-Pierre PAPET**, Cosmetic Valley, Chartres, mppapet@cosmetic-valley.com - **Alain ROUSSEL**, CBM CNRS Orléans, roussel@cnrs-orleans.fr - **Marie-Claude VIAUD**, Université de Tours, Marie-claude.viaud-masuard@univ-tours.fr

Président : **Norbert BROMET**, Biotec Centre - Tél : 02 38.76 20 60 - Mél : n.bromet@biotec-dmpk-adme.com
Secrétariat : 36 avenue Léonard de Vinci, 37 400 AMBOISE - Tél / Fax : 02 47 30 02 63 - Mél : biotechnocentre@wanadoo.fr

INDEX DES AUTEURS

21^e Colloque BIOTECHNOCENTRE

23 - 24 Octobre 2008

Le 21^e colloque de Biotechnocentre se tiendra les 23 et 24 octobre au domaine de Seillac.

Le programme de cette vingt et unième édition couvrira les principales thématiques actuelles et en devenir qui font la force de la recherche en Biologie –Santé en région Centre. Ceci revêt une importance toute particulière à l’heure où les réseaux de recherche régionale et interrégionale vont se mettre en place.

Au cours du colloque seront présentés les résultats des projets retenus et financés par la Région Centre lors des derniers appels à projet Biotechnocentre, ainsi que tous les projets retenus et financés par la Région Centre pour ce qui concerne les appels 2007 et 2008.

Je tiens à remercier tous ceux qui permettent l’organisation matérielle de cette manifestation et en particulier le Conseil Régional de la Région Centre qui a maintenu son soutien financier indispensable à la tenue de ce colloque. Comme vous pourrez le remarquer cette année, nous avons recherché des ressources de financement extérieur et au-delà des sociétés pharmaceutiques qui nous ont toujours été fidèles, non seulement les sociétés de cosmétiques de la Région nous ont apporté leur concours, mais également un certain nombre de partenaires dont les Banques et des petites PME innovantes.

Ne manquez pas de consulter les affiches, sources d’échanges fructueux et de collaborations scientifiques entre équipes pluridisciplinaires. Cette année, nous récompenserons les deux meilleures d’entre elles par des prix conséquents.

Nous comptons sur vous pour assurer le succès de ce 21^e colloque et démontrer clairement le dynamisme de la recherche dans notre Région Centre, pôle de la cosmétique, du mieux être et de la santé.

Bon colloque Biotechnocentre 2008.

Norbert BROMET
Président de Biotechnocentre

Résumés des posters.....	page 2
Résumés des conférences.....	page 26
Index des auteurs.....	page 36

POSTERS

- P1 - Etude des propriétés de transglutamination de deux inhibiteurs des protéases à sérine de neutrophile à potentiel thérapeutique**
K.Baranger, ML. Zani, V. Labas, S. Dallet-Choisy, T. Moreau..... p4
- P2 - Modulation of the immune response by the carbohydrate tumor antigen Tn**
V. Bourgeaux, N. Bureaud, G-A. Cremer, A. Delmas, V. Piller, F. Piller..... ..p5
- P3 – Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes pour la détection d'ADN double-brin**
B-L. Renard, U. Asseline.....p6
- P4 – Compartmental modeling to set up the most appropriate pattern for a repeated ¹⁴C administration during PK or QRLG studies**
J. M. Cardot, C. Bounaix, M. Bromet-Petit, N. Brometp7
- P5 - 1ère structure 3D d'une défensine antibactérienne de poulet**
C. Derache, H. Meudal, V. Aucagne, M. Cadène, A. Delmas, A-C. Lalmanach, C. Landon.... ..p8
- P6 - Cigarette smoke induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent**
E. Doz, N. Noulin, E. Boichot, I. Guénon, L. Fick, M. Le Bert, V. Lagente, B. Ryffel, B. Schnyder, V.F.J Quesniaux, I. Couillin.....p9
- P7 - Characterization of NK cells from bovine neonates.**
J. El Hmouzi, A. Storset, P. Boysen, F. Laurent, F. Drouetp10
- P8 - Uric is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis**
P. Gasse, N. Riteau, V. Petrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V.F.J. Quesniaux, B. Ryffel, I. Couillinp11
- P9 - Occurrence of stromules in specialised cells highly expressing the methyl erythritol phosphate pathway in the anticancer alkaloid-producing plant *Catharanthus roseus***
G. Guirimand, V. Courdavault, A. Oudin, B. ST-Pierre, V. Burlat.....p12
- P10 - CrMRP1, l'orthologue du transporteur ABC humain MRP7/ABCC10 chez *Catharanthus roseus***
T. Guizani, C. Guibert, S. Triki, B. St-Pierre, E. Ducos.....p13
- P11 – Evaluation of pimonidazole as a marker of hypoxia in vitro**
D. Helene, B. El Hafny- Rahbi, C. Kieda.....p14
- P12 - Le CIRM-Bactéries Pathogènes : une collection de souches au service de la recherche**
E. Helloin, C. Slugocki, I. Jacques, P. Germon.....p15

- P13 - GenoTrans : Une plateforme mutualisée de puces à ADN pour le génotypage et le transcriptome, ouverte à la communauté scientifique de la Région Centre**
Y. Héroult, S. Briault, V. Quesniaux, C. Kieda.....p16
- P14 - Spermatozoa fertility biomarkers display by Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry**
V. Labas, C. Belleannée, M. Belghazi, F. Dacheux, J-L. Dacheux.....p17
- P15 - Endothelial precursor cells model to target tumor vasculature**
N. Lamerant, A. Mazan, K. Szczepanek, M. Mitterrand, E. Destouches, C. Grillon, C. Kieda.....p18
- P16 - Identification des partenaires de DSP1 dans l'embryon chez *Drosophila melanogaster*.**
O. Lamiable, M. Decoville, D. Locker.....p19
- P17 - Production of peptide thioesters Towards mitogaligin synthesis, a cytotoxic 97-residue protein.**
D. Lelièvre, P. Barta, V. Aucagne, A. Delmas.....p20
- P18 - Allergic lung inflammation is mediated by soluble but not transmembrane TNF, and is attenuated by selective inhibition of soluble TNF by dominant-negative TNF biologics**
I. Mercier, S. Schnyder, I. Couillin, V. Quesniaux, D.E. Szymkowski, F. Erard, B. Ryffelp21
- P19 - Frz, une région métabolique impliquée dans la régulation de gènes de virulence et d'adaptation à l'hôte des *Escherichia coli* à pathogénicité extra-intestinale**
G. Rouquet, G. Porcheron, N. Chanteloup, C. Barra, P. Bauchart, U. Dobrindt, P. Gilot.....p22
- P20 - Role of Nitric Oxide in angiogenesis: regulation of adhesion molecules expressed on endothelial cells**
A. Sélo, C. Kieda, C. Grillon.....p23
- P21 - Synthesis of Glycocluster-Tumor Antigenic Peptide Conjugates for Dendritic Cell Targeting**
O. Srinivas, P. Larrieu, G. Garipova1, E. Duverger, C. Boccaccio, M-T Bousser, M. Monsigny, J-F Fonteneau, F. Jotereau, A-C Roche.....p24
- P22 - Rôle du gène à homéodomaine *Otx1* dans la formation des processus ciliaires chez la souris**
B. Villar-Cheda, C. Rocancourt, A. Menuet, S. Mazan.....p25

RESUMES DES POSTERS

21^e Colloque BIOTECHNOCENTRE

23 - 24 Octobre 2008

P1**Etude des propriétés de transglutamination de deux inhibiteurs
des protéases à sérine de neutrophile à potentiel thérapeutique**

BARANGER K.(1), ZANI ML.(1), LABAS V.(2), DALLET-CHOISY S.(1) et MOREAU T.(1)

(1) Inserm U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires et IFR135 Imagerie Fonctionnelle, TOURS, France

(2) Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle, INRA, TOURS

E-mail : moreaut@univ-tours.fr

L'élafine et le SLPI sont deux inhibiteurs de protéases particulièrement attractifs dans le cadre d'une utilisation thérapeutique anti-inflammatoire visant à cibler les protéases à sérine de neutrophile (élastase, protéase 3, cathepsine G) dans les pathologies pulmonaires. L'élafine est libérée à partir d'un précurseur actif, la trappine-2 (ou pré-élafine), qui comporte en plus du domaine élafine inhibiteur, un domaine cémentoïne à son extrémité N-terminale, riche en séquences de type GQDPVK substrat de transglutaminase. Dans nos travaux précédents, nous avons démontré que la trappine-2 et l'élafine, pouvaient se lier covalamment à différentes protéines de matrice extracellulaire dont la fibronectine, grâce à l'action d'une transglutaminase tissulaire. Dans ces conditions, nous avons également montré que l'inhibiteur ainsi lié conservait ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de ses protéases cibles. Par ailleurs, il a été démontré que le SLPI pouvait *in vivo* être associé aux fibres d'élastine. Les objectifs de ce travail sont 1/ d'évaluer la sensibilité du SLPI à l'action d'une transglutaminase et 2/ d'identifier les sites de transglutamination mis en jeu dans la trappine-2 et le SLPI.

Les résultats montrent que le SLPI peut être lié à la fibronectine et à l'élastine par l'action de la transglutaminase 2 tout en restant inhibiteur de l'élastase et de la cathepsine G. Les sites de transglutamination dans la trappine-2 et le SLPI impliquent à la fois des glutamines et des lysines du motif consensus comme le montre l'analyse en spectrométrie de masse de différents types de conjugués formés avec la transglutaminase 2.

L'ancrage des inhibiteurs à des protéines de la matrice extracellulaire par les transglutaminases tissulaires, dont l'expression est fortement augmentée au cours de l'inflammation, pourrait permettre d'augmenter leur biodisponibilité lors d'une administration thérapeutique.

P2**Modulation of the immune response by the carbohydrate tumor antigen Tn.**

Vanessa Bourgeaux, Nicole Bureaud, Gaëlle-Anne Cremer, Agnès Delmas, Véronique Piller, Friedrich Piller

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, affilié à l'INSERM et conventionné avec l'Université d'Orléans, rue Charles Sadron 45071 Orléans, France mél: piller@cnr-orleans.fr

The Tn antigen (GalNAc α Ser/Thr) is a carbohydrate tumor antigen present on more than 80 % of adenocarcinomas including tumors of the breast, colon, pancreas. It is associated with mucins like MUC1, an integral membrane glycoprotein with an extracellular domain made up of multiple identical 20 amino acid repeats (variable tandem repeats, VTR). Because of its overexpression it is like the Tn antigen a well known tumor antigen. It was therefore interesting to investigate the immune response when these two antigens are associated.

Due to the low homology between human and mouse MUC1VTRs the human VTR is a very good immunogen in C57BL/6 mice even when injected in association with the weak adjuvant Alum. However, when the antigens are enzymatically glycosylated with α GalNAc the immune response is completely abolished. Association of glycosylated MUC1 with strong adjuvants did not stimulate the immune response indicating the induction of tolerance. Further experiments suggested that the tolerance was not deletional and that MUC1 reactive T cells were not destroyed by immunization with glycosylated MUC1. Since glycosylated MUC1 is efficiently taken up by antigen presenting cells, processed and presented by the MHC, it is likely that glycosylated MUC1 inhibits the maturation and activation of antigen presenting cells. This was confirmed by booster injections which together with strong adjuvants can restore the response to glycosylated MUC1. Using completely synthetic (glyco)peptide antigens we determined that the reduction of the immune response is independent of the position or the number of GalNAc residues. On the other hand GalNAc must be exposed since masking by the addition of galactose restored the response to normal levels.

The results indicate that antigen presenting cells in mice take up the GalNAc bearing antigens through a lectin like receptor which inhibits the maturation/activation of antigen presenting cells and thus triggers the down regulation of the immune response by the carbohydrate tumor antigen Tn.

P3

**NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES POUR LA
DETECTION D'ADN DOUBLE-BRIN**

Renard Brice-Loïc et Asseline Ulysse

*Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301-CNRS, conventionnée avec l'Université
d'Orléans et l'INSERM. Rue Charles Sadron-45071-Orléans Cedex-02-France*

asseline@cns-orleans.fr

Les sondes oligonucléotidiques fluorescentes sont utilisées dans de nombreux domaines (recherche fondamentale, diagnostic, biotechnologie....)¹. De nombreux exemples de sondes émettant un signal modifié en présence de leur séquence complémentaire en simple brin, attestant de l'hybridation, ont été décrits au cours des dernières années. Nous présentons de nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes qui sont capables de reconnaître des séquences d'ADN en double brin en produisant une augmentation importante de l'intensité du signal lors de l'hybridation.² Ces sondes sont constituées d'oligonucléotides pyrimidiques, se fixent dans le grand sillon de l'ADN en double-brin par formation de liaisons hydrogène avec une séquence de purines contiguës, et sont marquées par des fluorophores de la famille des cyanines monométhines qui possèdent des propriétés intercalantes et dont la fluorescence est sensible à l'environnement.

Nous avons sélectionné un marqueur et les paramètres de sa liaison aux oligonucléotides qui permettent la formation de triples hélices avec une augmentation importante de l'intensité du signal fluorescent émis par la sonde (jusqu'à 13 fois pour des structures comportant 17 triplets de bases). La présence du marqueur stabilise les triples hélices formées et la spécificité de l'hybridation est conservée

1. Asseline, U. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 491.
2. Renard, B.-L., Lartia, R., Asseline, U. *Org. Biomol. Chem.* **2008**. DOI: 10.1039/b813289e

P4**COMPARTMENTAL MODELING TO SET UP THE MOST APPROPRIATE PATTERN FOR A REPEATED ¹⁴C ADMINISTRATION DURING PK OR QRLG STUDIES**

J. M. Cardot : Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Biopharmacie, 28 rue Henri Dunant, 63001 Clermont Ferrand

C. Bounaix, M. Bromet-Petit, N. Bromet : Biotec Centre, 10 avenue Claude Guillemin, 45071 Orléans Cedex 2

The studied case is the one where a long half-life was observed during PK or QRLG studies after a single administration. The next question arising is what is the most appropriate pattern for a repeated administration (cold/isotope ratio) for quantifying the amount present in the deep compartment.

Two approaches were followed:

- First: chronic administration with the cold compound for n-1 days of the total n days.
The last administration being realised with a radiolabelled compound.
- Second: chronic administration for the whole n days using the radiolabelled compound.

Good sense of approach:

An accumulation is expected after chronic administration, when two conditions arise after single administration:

- 1: a long half life of elimination is observed
- 2: combined with a heavy AUC of this phase

Mathematical approach:

When an accumulation is suspected, there is no other alternative than to provide the ¹⁴C-compound to all the administrations, during a chronic administration study.

P5

1^{ère} structure 3D d'une défensine antibactérienne de poulet

Chrystelle Derache¹, Hervé Meudal², Vincent Aucagne², Martine Cadène², Agnès Delmas², Anne-Christine Lalmanach¹, Céline Landon²

1. Unité Infectiologie Animale et Sante Publique, INRA, Centre de Recherche de Tours, 37380 Nouzilly, France

2. Centre de Biophysique Moléculaire. CNRS UPR4301. Rue Charles Sadron 45071 Orléans cedex 02. France

Les salmonelles, responsables de la majorité des cas de toxi-infections alimentaires, représentent une préoccupation majeure de santé publique. La persistance de bactéries dans les élevages de volaille constitue une source de contamination importante pour les produits alimentaires qui en sont issus. Pour faire une sélection génétique des animaux résistants au portage de ces bactéries, ou pour stimuler l'immunité de la muqueuse digestive et ainsi éviter l'utilisation controversée d'antibiotiques, il faut d'abord comprendre les mécanismes de défense des oiseaux. C'est pourquoi nous nous intéressons aux défensines aviaires, petites protéines antimicrobiennes et composants clé du système de défense immunitaire inné.

L'objectif est d'étudier les activités antibactériennes et la structure tridimensionnelle de la première défensine de poulet : avBD2.

L'extraction/purification de la protéine avBD2 naturelle à partir de la moelle osseuse n'ayant pas permis d'obtenir un échantillon de pureté suffisante pour l'étude structurale par RMN, et la surexpression de avBD2 dans *E.Coli* n'ayant pas non plus été satisfaisante, nous avons produit la protéine par synthèse peptidique.

Nous avons établi la structure tridimensionnelle de avBD2, première structure de défensine de poulet, par Résonance Magnétique Nucléaire et modélisation moléculaire. Nous avons réalisés les tests d'activités antibactériennes sur une série de bactéries gram+ et gram-.

La comparaison de la structure 3D obtenue (et de ses propriétés de surface) avec d'autres protéines antimicrobiennes, en particulier avec la sphéniscine du manchot (seule autre défensine d'origine aviaire), permettra de dégager les premières relations entre la structure et la fonction de cette famille de protéine.

P6

Cigarette smoke induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent

Emilie Doz, Nicolas Noulin, Elisabeth Boichot, Isabelle Guénon, Lizette Fick, Marc Le Bert, Vincent Lagente, Bernhard Ryffel, Bruno Schnyder, Valérie F.J, Quesniaux and Isabelle Couillin

University of Orleans and CNRS UMR6218, Molecular Immunology and Embryology, Orléans, France; Key-Obs S. A., Orleans, France; INSERM U620, University of Rennes 1, Rennes, France; Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Cape Town, RSA.

Both first authors contributed equally to the work.

Key words: Lung, Inflammation, Cigarette smoke, TLR, IL-1, MyD88, LPS.

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr, bryffel@cnrs-orleans.fr

Acute cigarette smoke exposure of the airways (two cigarettes twice daily for three days) induces acute inflammation in mice. Here we show that airway inflammation is dependent on Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and interleukin IL-1R1 signaling. Cigarette smoke induced a significant recruitment of neutrophils in the bronchoalveolar space and pulmonary parenchyma, which was reduced in TLR4, MyD88 and IL-1R1 deficient mice. Diminished neutrophil influx was associated with reduced IL-1, IL-6 and KC levels and matrix metalloproteinase-9 activity in the bronchoalveolar space. Further, cigarette smoke condensate (CSC) induced a macrophage proinflammatory response *in vitro*, which was dependent on MyD88, IL-1R1 and TLR4 signaling, but not attributable to LPS. Heat shock protein 70, a known TLR4 agonist, was induced in the airways upon smoke exposure which probably activates the innate immune system via TLR4/MyD88, resulting in airway inflammation. CSC-activated macrophages released mature IL-1 β only in presence of ATP whereas CSC alone promoted the TLR4/MyD88 signaling dependent production of IL-1 α and pro-IL-1 β implicating cooperation between TLRs and the inflammasome.

In conclusion, acute cigarette exposure results in LPS independent TLR4 activation, leading to IL-1 production and IL-1R1 signaling, what is crucial for cigarette smoke induced inflammation leading to COPD with emphysema.

P7

Characterization of NK cells from bovine neonates.

Jamila El Hmouzi (1), Anne Storset (2), Preben Boysen (2), Fabrice Laurent (1) and Françoise Drouet (1)

1 - INRA, UR 1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly (Équipe : Contrôle et Immunologie des Maladies Entériques du Nouveau-né)

2 – Norwegian School of Veterinary Science, NO-0033 Oslo (Department of Food Safety and Infection Biology)

The neonatal period is characterized by a high susceptibility to infections. Innate immunity against pathogens represents the critical first-line barrier of host defenses, especially in neonates which have a naive adaptive immune system. One main objective of our laboratory is to identify the specificities of innate immune cells from ruminant neonates among which NK cells play a key role because of their capacity to produce cytokines especially high amounts of $INF\gamma$ upon activation, and their cytotoxic properties.

Our goal was to characterize NK cells from bovine neonates by comparing their phenotype and functions to those of adults. We isolated and analyzed blood NK cells using the monoclonal antibody anti-NKp46 which recognizes specifically bovine NK cells (Storset *et al.*, 2004). We demonstrated that a crucial moment in ontogenesis of bovine NK cells happens at the end of the first week of life: neonates younger than 8 days have 4 to 5 times less blood NK cells than older calves and adults. Functional analyses suggest that neonate NK cells proliferate more rapidly and are more cytotoxic than adult ones. This highest cytotoxicity can be partly explained by a stronger expression of the activating receptor NKp46 at the surface of NK cells from neonates.

However, no difference in $INF\gamma$ response to IL-12 stimulation was observed between neonate and adult NK cells.

Finally, to validate the functional differences observed, we intend to study the capacity of NK cells to control the infection of bovine epithelial cell lines by the protozoan parasite *Cryptosporidium parvum*.

Storset A.K., Kulberg S., Berg I., Boysen P., Hope J.C. and Dissen E. 2004. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur. J. Immunol.*, 34, 669-676

Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury

inflammation and fibrosis

Gasse P. (1*), Riteau N. (1*), Pétrilli V. (2), Tschopp J. (2), Lagente V. (3), Valérie F. J. Quesniaux V.F.J. (1), Ryffel B. (1) and Couillin I. (1, 4).

University of Orleans and CNRS, IEM-UMR6218, Orleans, France¹, Department of Biochemistry, University of Lausanne, 1066 Epalinges, Switzerland² and INSERM U620, Université de Rennes1, France³. Key-Obs S. A., Orleans, France⁴

*These authors contributed equally to this work

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Key words: Uric acid, Inflammasome, Fibrosis

Introduction: Lung injury leads to pulmonary inflammation and fibrosis through myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and interleukin-1 receptor 1 (IL-1R1) signalling pathway (*J Clin Invest*, 2007, 117: 3786-3793). However, the molecular mechanisms by which lung injury triggers IL-1 β production, inflammation and fibrosis remain poorly understood. Based on the fact that cell/tissue injury and necrosis result in production of uric acid, we hypothesised that uric acid crystals formed at the injury site might represent a key danger signal activating the inflammasome to release IL-1 β thereby causing inflammatory lung pathologies.

Methods: Mice deficient for MyD88, IL-1R1, NALP3, ASC or Casp-1 on C57Bl/6 genetic background were used. Uric acid concentration was determined in bronchoalveolar lavages and lung homogenates. Bleomycin sulfate (10mg/kg) in saline, uric acid or allopurinol crystals (5-50mg/kg) or saline alone were given through the airways by nasal instillation. The number of cells, chemokines, cytokines and TIMP-1 in the bronchoalveolar space and MPO activity in the lung were evaluated. MMP-2 and MMP-9 levels were determined by gelatin zymography.

Results: Here we show that lung injury depends on the NALP3 inflammasome which is triggered by uric acid locally produced in the lung upon bleomycin-induced DNA damage and degradation. Reduction of uric acid levels using the inhibitor of uric acid synthesis allopurinol or uricase lead to a decrease in bleomycin-induced IL-1 β production, lung inflammation, repair and fibrosis. Further, local administration of exogenous uric acid crystals recapitulates lung inflammation and repair which depend on the NALP3 inflammasome, MyD88 and IL-1R1 pathways, and TLR2 and TLR4 for optimal inflammation, but are independent of the IL-18 receptor.

Conclusions: Uric acid released from injured cells constitutes a major endogenous danger signal which activates the NALP3 inflammasome leading to IL-1 β production. Reducing uric acid tissue levels represents a novel therapeutic approach to control IL-1 β production and chronic inflammatory lung pathology.

P9**Occurrence of stromules in specialised cells highly expressing the methyl erythritol phosphate pathway in the anticancer alkaloid-producing plant *Catharanthus roseus***

Grégory GUIRIMAND; Vincent COURDAVAULT; Audrey OUDIN; Benoit ST-PIERRE;
Vincent BURLAT

EA2106 -Biomolécules et Biotechnologies Végétales- Université de Tours, 37200 Tours

In higher plants, the subcellular localisation of the methyl erythritol phosphate (MEP) pathway within the plastids is well documented with GFP imaging and immunocytochemical studies. Two of these studies provide additional immunogold evidence of the accurate localisation of the MEP pathway enzymes within the stroma of chloroplasts. Additionally, one study shows the immunolocalisation of a stroma-accumulating MEP pathway enzyme within stromules in maize root cells undergoing colonisation by symbiotic arbuscular mycorrhiza fungi. The stromules are long stroma-filled and thylakoid free plastid extensions that are cell-specific and developmentally regulated. Therefore, these results raised the question about the necessity of stromules in cells expressing MEP pathway enzymes. Here, we took advantage of the previously demonstrated differential level of expression of the MEP pathway within different cell types of the aerial organs of the anticancer monoterpene indole alkaloid (MIA) producing plant *Catharanthus roseus* to investigate the possible correlation between stromules occurrence and the level of expression of MEP pathway enzymes. Using GFP imaging and immunogold studies focused on the MEP pathway enzyme 4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl diphosphate synthase (HDS), we show that stromules are present on the relatively small chloroplasts of the MEP pathway-rich internal phloem associated parenchyma specialised cells but not on the large chloroplasts of MEP pathway-poor mesophyll cells. The possible role of stromules to help maintaining the metabolic flux between plastids and other organelles during the biosynthesis of isoprenoid-derived metabolites such as MIA in MEP pathway-enriched specialised cells is discussed.

P10

CrMRP1*, l'orthologue du transporteur ABC humain MRP7/ABCC10 chez *Catharanthus roseus

Tayssir GUIZANI^{¶,§}, Clotilde GUIBERT[¶], Saïda TRIKI[§], Benoit St-PIERRE[¶] et Eric DUCOS

[¶] EA2106 -Biomolécules et Biotechnologies Végétales- Université de Tours, 37200 Tours – FRANCE

[§] Laboratoire de Biochimie – Faculté des Sciences de Tunis, 2092 Tunis – TUNISIE

Les MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*) appartiennent à une des plus grandes familles de gènes chez les eucaryotes. L'analyse phylogénétique des transporteurs ABC de type MRP chez la plante, répartie les protéines dans trois clades. Les clades I et II spécifiques aux plantes sont partiellement caractérisés et sont impliqués dans la régulation de canaux ioniques, la détoxification cellulaire ou encore le transport de phytohormones et de métabolites secondaires¹. A ce jour, le clade III n'est pas caractérisé et est le seul à contenir des gènes de plantes et de mammifères.

La pervenche de Madagascar (*C. roseus*) produit naturellement les vinca-alcaloïdes antitumoraux vinblastine et vincristine. Chez l'homme, l'extrusion des vinca-alcaloïdes de tumeurs chimiorésistantes implique le MRP ABCC10 du clade III². Afin de déterminer si l'orthologue d'ABCC10 chez *C. roseus* prend aussi en charge les vinca-alcaloïdes, le cDNA correspondant a été cloné : *CrMRP1*. Les protéines ABCC10 et *CrMRP1* partagent la même organisation en domaines et, comme décrit pour le gène humain³, un épissage alternatif de l'ARNm immature prédit la perte de la 1^{ère} hélice transmembranaire : la conservation de ce mécanisme suggère un rôle important dans la fonctionnalité de ce transporteur. Par ailleurs, alors que les MRP des clades I et II sont issus d'évènements de duplications récents, on ne trouve dans le clade III qu'un seul MRP par génome. L'analyse génomique par BLAST révèle également que le clade III est absent des organismes « vivant dans l'eau » (ex. : algue, poisson, nématode, protozoaire). La fonction physiologique et l'évolution particulière de ce clade sont abordées dans le cadre d'une possible implication de *CrMRP1* dans le transport des vinca-alcaloïdes et de l'homéostasie de l'eau.

¹ Rea P.A. (2007) *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 347-375.

² Hopper-Borge E. *et al* (2004) *Canc. Res.* **64**: 4927-4930.

³ Kao H.-H. (2002) *et al.* *J. Biomed. Sci.* **10**: 98-110.

P11**EVALUATION OF PIMONIDAZOLE AS A MARKER OF HYPOXIA IN VITRO**

Dominique HELENE, Bouchra EL HAFNY- RAHBI, Claudine KIEDA

Centre de Biophysique moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 4301, 45045 Orléans, France.

e-mail : kieda@cnrs-orleans.fr

The heterogeneity in oxygen concentration, between tissues and within the same organ, is of particular physiological importance and significant for pathophysiology. It is well described that hypoxia is associated to tumoral progression, aggressiveness and increase of metastatic potential. Thus, various assays have been developed to evaluate hypoxia by detection of the oxygen tension changes in tumors. Among these methods, the 1-[(2-hydroxy-3-piperidinyl)propyl]-2-nitroimidazole hydrochloride (pimonidazole) has been used in clinical and experimental studies as hypoxia marker to correlate with tumor aggressiveness. In hypoxic cells, the pimonidazole is specifically reduced and binds to proteins to form adducts which can be detected in real time by image analysis or on biopsies by immunochemistry.

In this study, we took advantage of the possibility to detect the pimonidazole by immunological analysis to use it as an hypoxia marker *in vitro*. We tested it on several cell lines: rat cardiomyocytes, human lymph node endothelial cells and human skin endothelial cells. We analyzed the binding of pimonidazole to cell proteins by immunocytochemistry, using an antibody anti-pimonidazole coupled to FITC. In hypoxic conditions (1% O₂), the labelling is significantly important compared to normoxia, showing an important amount of adduct formed between pimonidazole and proteins. To evaluate this difference quantitatively, we analyzed the cells by flow cytometry, in the same conditions as described previously. The fluorescence intensity in hypoxia, for all lines tested, is significantly increased. We also analyzed the binding of pimonidazole to proteins after exposure the cell cultures to hypoxia (1% O₂) followed by re oxygenation (20% O₂). The fluorescence intensity observed after re oxygenation is very low as observed in normoxia while it is strongly increased in hypoxia. Our results show that the pimonidazole can be used as an hypoxia marker. It can be used to test the efficacy of some drugs to correct the oxygen tension, *in vitro* as well as *in vivo*.

P12**Le CIRM-Bactéries Pathogènes : une collection de souches au service de la recherche**

Emmanuelle Helloin, Cindy Slugocki, Isabelle Jacques, Pierre Germon
CIRM-Bactéries Pathogènes, UR 1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre de
recherche INRA, 37380 Nouzilly

Le CIRM est un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) géré par l'INRA et dédié à la préservation et à l'exploration de la biodiversité microbienne. Un de ses objectifs est de faciliter la diffusion des ressources microbiologiques de l'INRA via leur distribution auprès de la communauté scientifique et industrielle. Il comprend plus de 15000 souches réparties sur 4 sites : Grignon (Levures), Marseille (Champignons filamenteux), Rennes (Bactéries alimentaires) et Tours (Bactéries pathogènes).

Le CIRM-Bactéries Pathogènes (CIRM-BP) est implanté au sein de l'unité Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP) du centre INRA de Tours. La gestion de la collection du CIRM-BP passe par les étapes d'acquisition, d'authentification, de préservation et de distribution des bactéries pathogènes. La collection regroupe actuellement des souches de 167 espèces appartenant à 57 genres différents isolées chez l'homme, l'animal ou de l'environnement.

Le CIRM-BP propose des services d'identification phénotypique et de conservation de souches sous la forme de dépôts ouverts ou de dépôts confidentiels sécurisés à l'usage exclusif du déposant. Au-delà de ces services, il développe des collaborations scientifiques afin d'étudier la biodiversité et les marqueurs moléculaires des bactéries pathogènes.

P13

GenoTrans : Une plateforme mutualisée de puces à ADN pour le génotypage et le transcriptome, ouverte à la communauté scientifique de la Région Centre

Yann Hérault, Sylvain Briault, Valérie Quesniaux, Claudine Kieda

Une plateforme destinée à l'analyse par puces à ADN vient de se mettre en place en Région Centre. Située sur le campus CNRS d'Orléans, cette plateforme est née d'une collaboration entre les partenaires suivants :

- le CNRS, plus précisément le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) et le laboratoire [Transgénèse et Archivage d'Animaux Modèles \(TAAM\)](#),
- l'Université d'Orléans, plus précisément le laboratoire Immunologie et Embryologie Moléculaires (IEM, Unité Mixte de Recherche Université-CNRS) et
- le Centre Hospitalier Régional d'Orléans (CHRO).

Elle est équipée des appareils suivants : **Plateforme Affymetrix** (Genechip GCS3000 7G System) comprenant un four d'hybridation, une station fluidique pour le lavage des lames et un scanner, Nanodrop, Bioanalyseur Agilent 2100, Appareils PCR, ...

Nommée GenoTrans (Genotypage et Transcriptome), cette plateforme propose l'infrastructure et les expertises techniques et méthodologiques nécessaires à :

- l'étude de l'expression de gènes (études de transcriptomes),
- le génotypage,
- l'étude des variants d'épissage,
- l'analyse du nombre de copies de gènes,
- l'analyse des SNP (« Single Nucleotide Polymorphism »),

Pour toute information, veuillez contacter les responsables scientifiques :

- **Yann Hérault**, Ph.D., IEM, UMR6218, Directeur du TAAM, yann.herault@cnrs-orleans.fr, Tel: 02-38-25-79-30/79-76,
- **Sylvain Briault**, MD, PhD, Laboratoire de Génétique Chromosomique - INSERM U930, CHR d'Orléans, sylvain.briault@chr-orleans.fr, Tel : 02-38-51-43-57,
- **Valérie Quesniaux**, Ph.D., IEM, UMR6218, Directrice de l'IEM, quesniaux@cnrs-orleans.fr, Tel : 02 38 25 54 38,
- **Claudine Kieda**, Ph.D., CBM, UPR4301, claudine.kieda@cnrs-orleans.fr, Tel : 02-38-25-55-61.

ou les responsables techniques : **Arnaud Duchon**, CNRS, IEM, UMR6218, duchon@cnrs-orleans.fr, **Marie-Laure Dessain**, CNRS, TAAM, UPS44, dessain@cnrs-orleans.fr, **Nathalie Lamerant-Fayel**, CNRS, CBM, UPR4301, lamerant@cnrs-orleans.fr, **Lekbir Baala**, CHRO, lekhir.baala@chr-orleans.fr.

P14

Spermatozoa fertility biomarkers display by Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry

Valérie LABAS⁽¹⁾, Clémence BELLEANNEE⁽²⁾, Maya BELGHAZI⁽¹⁾, Françoise DACHEUX⁽²⁾, Jean Louis DACHEUX^(1,2)

(1) *Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle – INRA Tours, F-37380 Nouzilly,*
(2) *UMR INRA-CNRS 6175, F- 3780 Nouzilly, France*

Currently, to search specific biomarkers in different fields, classical differential proteomic analysis are employed. Different methods using separations of proteins from cells lysates were achieved with 1D-2D gels/1D-2D HPLC or SELDI-TOF. These approaches require proteins extraction steps with laborious and time-consuming sample analysis to display specific markers from a variety of test conditions. Since 1996, Intact-Cell MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS) technology has been developed in the area of micro organisms for the identification of bacteria. ICM-MS was recently extended to the analysis of small proteins on eukaryote cells. In this study, ICM-MS profiling experiments was used to evaluate its potential as a new approach for spermatozoa markers display. The goal of this study was to discriminate peptides or proteins which could be involved in the post testicular differentiation of the gamete and potentially linked to their fertility ability.

Epididymal sperm samples were collected in 4 epididymal regions. The whole cells were washed and spotted with sinapinic acid matrix. Spectra were recorded on a MALDI-TOF mass spectrometer, operating in positive linear mode in the 2000-20 000 m/z mass range. Data processing was performed using MassLynx software.

The mass spectra obtained showed good reproducibility and repeatability between and within replicates. For immature sperm, 137 ions could be detected and 156 for mature sperm. Peaks presenting decreasing or increasing intensities are observed for sperm from different regions of the epididymis. These changes in ratio intensities allow us to differentiate immature and mature sperm respectively with 22 and 50 specific ions.

After subcellular fractionation, ICM-MS spectra were obtained from intact cells, membrane extract and cytoskeleton extract. Notably ions found to be specific were also found in the detergent extract, suggesting their membrane association.

In conclusion, ICM-MS gives the opportunity to screen rapidly different physiological cellular states and to display specific biomarkers. While the spectra from whole cells reflect only a small part of the cellular proteome, ICM-MS gives new information on peptides and proteins modifications and allows subcellular localization within complementary mass range to 1D-2D gel electrophoresis.

P15

Endothelial precursor cells model to target tumor vasculature

Lamerant N., Mazan A., Szczepanek K., Mitterrand M., Destouches E., Grillon C. and Kieda C.

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

e-mail : lamerant@cnrs-orleans.fr

Angiogenesis is the ability of endothelial cells to form new blood vessels and represents a critical step in tumor development and dissemination. Typically, without access to oxygen and nutrients, a tumor cannot grow more than 2 mm in diameter. But in response to hypoxia that occurs into the tumor and to other environmental and cellular stimuli, the tumor expresses various molecules which, as VEGF, promote angiogenesis. The new blood-vessels present within the tumor are formed from recruited mature endothelial cells (ECs) or endothelial progenitor cells (EPCs). EPCs from the bone marrow circulate in the peripheral and cord blood. Under the influence of different stimuli, they undergo differentiation into ECs, lining the inner lumen of blood and lymphatic vessels.

The goal of our research is to develop a model of ECs that could mimick the EPCs that are circulating in the blood upon recruitment from the bone marrow to home into pathological sites as tumors, upon attraction by locally synthesized chemokines.

For this, EPCs models were obtained after the isolation of cells from aorta-gonad-mesonephros (AGM) region of mouse embryos. Cells from 10.5 dpc and 11.5 dpc were immortalized and characterized with regards to various markers associated to the endothelial lineage. Two different cell lines, named MAgEC 10.5 and MAgEC 11.5, were obtained and were shown to represent given stages of differentiation and as such, could potentially be used in targeted cancer therapy as well as for post ischemic wound healing.

This innovative approach utilizes the fact that circulating precursors of ECs migrate to the place of ongoing angiogenic process recruited there by chemokines and growth factors.

P16**Identification des partenaires de DSP1 dans l'embryon chez *Drosophila melanogaster*.**

Lamiable Olivier, Decoville Martine et Locker Daniel
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2.
Unité propre de recherche n°4301 du CNRS conventionnée avec l'université d'Orléans.
Tel 02 38 25 55 39, e-mail lamiable@cnrs-orleans.fr

Au cours du développement, les cellules se différencient sous l'influence de nombreux facteurs transitoires en jouant sur l'expression de leurs gènes. Une fois mis en place, le profil d'expression génique est transmis aux cellules filles. Ce phénomène met en jeu des mécanismes épigénétiques qui remodelent localement la structure de la chromatine au niveau des gènes cibles. Chez *Drosophila melanogaster*, les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) participent au maintien du profil d'expression des gènes homéotiques au cours du développement. Ces protéines agissent au sein de complexes multiprotéiques. Trois complexes PcG (PRC1, PRC2 et PhoRC) et cinq complexes TrxG (TAC1, BRM, GAF-FACT, ASH1 et ASH2) sont identifiés.

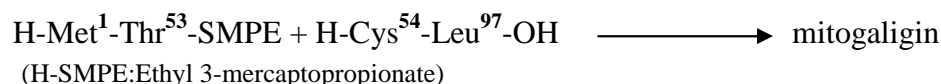
La protéine DSP1 (Dorsal Switch Protein 1) est une protéine à boîtes HMG (High Mobility Group) agissant comme une protéine de type Polycomb et Trithorax. Par tamisage moléculaire, nous avons montré que la protéine DSP1 est présente au sein de complexes de poids moléculaire 100 kDa à 1 MDa qui varient dans leur composition suivant le stade embryonnaire. Dans le but d'identifier ces complexes, nous avons entrepris la purification des partenaires de DSP1 à l'aide d'anticorps. Deux approches ont été effectuées parallèlement : l'immunopurification directe avec des anticorps dirigés contre la protéine DSP1 et la technique TAP-tag. Cette dernière nécessite de disposer de drosophiles exprimant la protéine DSP1 étiquetée par des épitopes. Dans les deux cas, l'identification des protéines purifiées a été effectuée par spectrométrie de masse. Les interactions avec les protéines identifiées seront validées *in vivo* (interaction génique) et *in vitro* (co-immunoprécipitation et/ou Pull-down).

P17

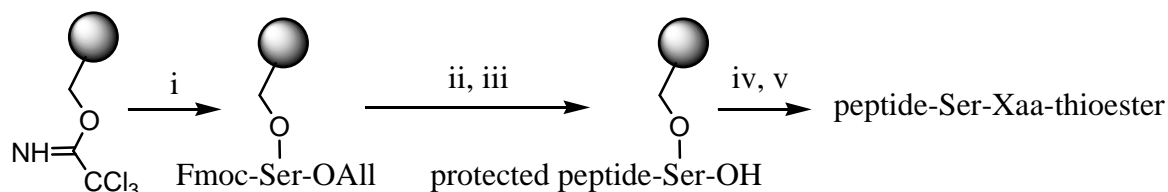
**Production of peptide thioesters
Towards mitogaligin synthesis, a cytotoxic 97-residue protein.**

Dominique Lelièvre*, Pavel Barta, Vincent Aucagne, Agnès Delmas
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans

Since developed by Kent and co-workers in 1994^[1], native chemical ligation methods have been used to synthesize various natural polypeptides and proteins. Up to now the preparation of the C-terminal peptide thioester using Fmoc chemistry remains the limiting stage of this methodology. Several available approaches have been developed with the aim of circumventing the instability of thioester under standard Fmoc-SPPS conditions. Among them, the strategy which involves the side chain anchoring of trifunctional amino acids^[2] seems the most attractive to the synthesis of long peptides thioester. In order to prepare a 53-mer peptide thioester with a serine at the antepenultimate C-terminal position, we set out to extend the side chain anchoring strategy to the β -hydroxyl side chain of serine. The 53-mer peptide thioester corresponds to the N terminal fragment of mitogaligin, a cytotoxic 97-residue protein, we plan to produce by native chemical ligation :



Our strategy, inspired by Hannessian^[3] and Mayer^[4] works is shown on the scheme below:



The feasibility of this strategy has been demonstrated using a short model peptide Ac-Ser-Arg-Ser-Thr-SMPE^[5] corresponding to C terminal sequence of the 53-mer peptide thioester. Special care was taken to minimize racemization during the amino acid thioester coupling. Then, the model peptide was ligated to the pentapeptide H-Cys-Thr-Trp-Ser-Leu-OH. The 53-mer peptide thioester is currently being synthesized by the methodology described above using a Wang-PEGA resin, a well-known resin for synthesis of long peptides^[6]

[1] Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H. *Science*. **1994**, 266: 776

[2] Wang, P. ; Miranda, L.P. *Int J Pept Res Ther*. **2005**, 11:117

[3] Hannessian, S.; Xie, F. *Tetrahedron Lett*. **1998**, 39: 733

[4] Yan, L.Z.; Edwards, P.; Flora, D.; Mayer, J.P. *Tetrahedron Lett*. **2004**, 45: 923

[5] Lelièvre, D.; Barta, P.; Aucagne, V.; Delmas, A.F. *Tetrahedron Lett*. **2008**, 49:4016

[6] Cremer, G.A.; Tariq, H.; Delmas, ; A.F. *J. Peptide Sci*, **2006**, 12:437

*Correspondance : lelievre@cnrs-orleans.fr

P18

Allergic lung inflammation is mediated by soluble but not transmembrane TNF, and is attenuated by selective inhibition of soluble TNF by dominant-negative TNF biologics

Isabelle Mercier, Silvia Schnyder, Isabelle Couillin, Valerie Quesniaux¹ David E. Szymkowski, Francois Erard and Bernhard Ryffel¹

TNF is a pleiotropic cytokine existing in both soluble and transmembrane forms which have markedly different roles in inflammation and immunity. TNF has emerged as an important factor in the pathogenesis of allergic lung inflammation; however, the respective roles of the soluble and transmembrane forms in allergic lung inflammation are not well understood. Here we use airway inflammation models in TNF knockout and transmembrane TNF knockin mice to demonstrate that the activity of soluble but not transmembrane TNF is sufficient to drive allergic inflammation of the airways. We also confirm the predominant inflammatory role of soluble TNF by showing that dominant-negative anti-TNF biologics, which antagonize soluble TNF yet spare transmembrane TNF activity, inhibit allergic lung inflammation as potently as the nonselective TNF inhibitor etanercept. DN-TNF biologics administered during ovalbumin immunization decreased lymphocyte and eosinophil recruitment into bronchoalveolar space and lung parenchyma, reduced specific IgE antibody in serum, and diminished goblet cell hyperplasia and eosinophilic inflammation in the lung. Levels of IL-5 and the chemokines CCL5, eotaxin, TARC were reduced in bronchoalveolar lavage. DN-TNF biologics reduced eosinophil recruitment into the bronchoalveolar space and lung even when given only during the antigen challenge phase. In conclusion, soluble TNF-selective DN-TNF biologics inhibit lymphocytic and eosinophilic influx, airway remodeling, and allergic inflammation in the lung, and may also have potential safety advantages due to preservation of the immunoprotective properties of transmembrane TNF.

This work was supported by Fondation de la Recherche, and EU funding FP6 NEST project N°028190 TB REACT.

P19**Frz, une région métabolique impliquée dans la régulation de gènes de virulence et d'adaptation à l'hôte des *Escherichia coli* à pathogénicité extra-intestinale**

Géraldine Rouquet¹, Gaëlle Porcheron¹, Nathalie Chanteloup¹, Claire Barra¹,
Philippe Bauchart², Ulrich Dobrindt², and Philippe Gilot¹

¹Laboratoire de Pathogénie Bactérienne, Unité d'Infectiologie Animale et de Santé Publique (UR 1282), Institut National de la Recherche Agronomique, Nouzilly, France; ²Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland

Nous avons identifié un opéron métabolique (*frz*) fortement associé aux souches d'*Escherichia coli* à pathogénicité extra-intestinale (ExPEC). L'opéron *frz* code les trois sous-unités d'un transporteur PTS de la sous-famille du fructose, un activateur transcriptionnel des systèmes PTS de la famille MgA, deux cétose-1,6-biphosphate aldolases, une kinase spécifique des sucres (famille ROK) et une protéine de la superfamille des cupines. Nous avons délété l'opéron *frz* et ainsi montré son implication dans la survie de la souche dans le milieu LB et dans le sérum, durant la phase stationnaire de croissance en condition d'anaérobiose partielle. *frz* procure également un avantage à la souche pour survivre dans le tractus intestinal. D'autre part, nous avons montré que *frz*, en régulant l'expression des fimbriae de type I (adhésine majeure des ExPEC), est impliqué dans l'adhérence de la bactérie aux pneumocytes humain de type II et aux cellules de foie de poulet, ainsi que dans son internalisation dans ces cellules. Des expériences de microarray ont indiqué que *frz* est impliqué dans la régulation de 27 gènes ($p < 0.05$) durant la phase stationnaire de croissance. Nos données suggèrent que *frz* code un système senseur de l'environnement impliqué dans la régulation de gènes de virulence et d'adaptation à l'hôte des ExPEC par des mécanismes moléculaires qui sont actuellement à l'étude dans notre laboratoire.

P20

**Role of Nitric Oxide in angiogenesis:
regulation of adhesion molecules expressed on endothelial cells**

Aude Sélo, Claudine Kieda & Catherine Grillon

Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301-CNRS, rue Charles Sadron 45071 Orléans

e-mail : catherine.grillon@cnrs-orleans.fr

Angiogenesis is a physiological process, which promotes the formation of new blood vessels from pre-existing ones, allowing tumor growth. Lots of studies design Nitric Oxide (NO[•]) as a critical mediator of angiogenesis. However, angiogenesis regulation by NO[•] is complex because it seems to affect different cell activities and is dependent on the micro-environment.

The aim of this work is to study the NO[•] dependent regulation of angiogenesis. For this purpose, we used immortalized endothelial microvascular cell lines from various tissues (skin, lymph node...), established in our laboratory (Kieda et al., 2002). We tried to answer the following questions:

- What is the effect of NO[•] on the angiogenic process ? In our model, we demonstrated that NO donors inhibit *in vitro* angiogenesis on Matrigel®. Moreover, we showed, by using NOS inhibitors, an essential role of endogenous NO[•] on angiogenic process,.
- Does NO[•] play a role in the cellular recognition of endothelial cells? NO[•] effect was assessed on adhesion molecule expression. A modulation of several adhesion molecules (CD31/PECAM-1, CD34, CD144/VE-cadherin, CD54/ICAM-1) by NO was shown and this is dependent on tissue origin and/or on NO concentration.
- What is the role of endogenous NO[•] produced during hypoxia? The same studies were performed in hypoxia, demonstrating the same modulations of adhesion molecules except for CD144/VE-cadherin which is not modulated.
- What do these molecular modulations mean with regards to cell adhesion? We studied homotypic adhesion of endothelial cells after NO[•] treatment. We demonstrated an increased adhesion in response to DPTA-NONOate, which may be linked to the observed increase of CD144/VE-cadherin expression.

In conclusion, NO[•] is necessary for angiogenesis but high concentrations are inhibitory. The expression of several adhesion molecules is modulated by exogenous or endogenous NO[•]. The next objective is to understand how cell adhesion and migration (activities required for angiogenesis) are modulated by NO[•]. This work will help to clarify NO[•] function during angiogenesis, in given microenvironmental contexts.

P21

**Synthesis of Glycocluster-Tumor Antigenic Peptide Conjugates
for Dendritic Cell Targeting**

Oruganti Srinivas¹, Pierre Larrieu², Goulnara Garipova¹, Eric Duverger¹, Claire Boccaccio, Marie-Thérèse Bousser¹, Michel Monsigny¹, Jean-François Fonteneau², Francine Jotereau², and Annie-Claude Roche¹

¹*Glycobiologie, Vectorologie et Traffic Intracellulaire, Centre de Biophysique Moléculaire
CNRS, Rue Charles-Sadron, 45071 Orléans, Cedex 2, France;*

²*INSERM, Unité 601, 44093 Nantes, France; Université de Nantes, Faculté des Sciences;*

The use of dendritic cells (DC) for the development of therapeutic cancer vaccines is attractive because of their unique ability to present tumor-epitopes *via* the MHC class I pathway to induce cytotoxic CD8⁺ T lymphocyte responses. C-type membrane lectins, DC-SIGN and the mannose receptor (MR), present on DC surface, recognize oligosaccharides containing mannose and/or fucose and mediate sugar-specific endocytosis of synthetic oligolysine-based glycoclusters. We therefore asked whether a glycotargeting approach could be used to induce uptake and presentation of tumor antigens by DC. To this end, we designed and synthesized glycocluster conjugates containing a CD8⁺ epitope of the Melan-A/Mart-1 melanoma antigen. These glycocluster-Melan-A conjugates were obtained by coupling glycosynthons: oligosaccharyl-pyroglutamyl- β -alanine derivatives containing either disaccharides, a dimannoside (Man α -6Man) or lactoside, or a Lewis oligosaccharide, to Melan-A 16-40 peptide comprising the 26-35 HLA-A2 restricted T cell epitope, extended with an oligolysine stretch at the C-terminal end. We showed by confocal microscopy and flow cytometry that fluorescent-labeled Melan-A glycoclusters containing either dimannoside or Lewis oligosaccharide were taken up by DC and concentrated in acidic vesicles; conversely lactoside glycopeptides were not at all taken up. Furthermore, using surface plasmon resonance, we showed that dimannoside and Lewis-Melan-A conjugates bind MR and DC-SIGN with high affinity. DC loaded with these conjugates, but not with the lactose-Melan-A conjugate, lead to an efficient presentation of the Melan-A epitope eliciting a CD8⁺ T-lymphocyte response. These data suggest that synthetically designed glycocluster-tumor antigen conjugates may induce antigen cross-presentation by DC and represent a promising tool for the development of tumor vaccines.

Correspondence : roche@cnsr-orleans.fr and joterau@nantes.inserm.fr

P22

Rôle du gène à homéodomaine *Otx1* dans la formation des processus ciliaires chez la souris

B. Villar-Cheda, C. Rocancourt, A. Menuet and S. Mazan

UMR 6218 Immunologie et embryologie moléculaires, 3b rue de la Férollerie, 45071 ORLEANS

Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent le développement des structures antérieures de l'oeil (iris, processus ciliaires) à partir de la marge ciliaire de la rétine ont attiré une attention particulière au cours des dernières années. Chez les mammifères adultes, ces structures constituent en effet la seule source identifiée de cellules souches rétiniennes, la prolifération cellulaire étant cependant réprimée dans l'état physiologique normal. La compréhension des programmes génétiques qui contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaires dans la marge ciliaire embryonnaire peut être importante pour comprendre à la fois les mécanismes de maintien de cellules souches rétiniennes à ce niveau et la répression de la prolifération cellulaire observée à l'état normal. Les mutants de souris *Otx1*^{-/-} fournissent un outil potentiellement intéressant pour leur décryptage, puisqu'ils sont caractérisés par l'absence de processus ciliaires chez l'adulte. Afin de mieux comprendre l'origine de ce défaut, nous avons effectué une analyse moléculaire et cellulaire de ces mutants à l'état embryonnaire. Les résultats obtenus montrent que la régionalisation de la marge de la rétine n'est pas affectée aux stades embryonnaires et que le territoire présomptif des processus ciliaires, dans la partie proximale de la marge, est bien spécifié. Les replis épithéliaux caractéristiques des processus sont également visibles aux stades embryonnaires mais ils présentent une réduction significative en taille. En accord avec cette observation, les analyses par immunohistochimie de la distribution de l'antigène nucléaire PCNA suggèrent un défaut de prolifération cellulaire dans cette zone. Ces données impliquent pour la première fois le gène *Otx1* dans le contrôle de la prolifération cellulaire au niveau de la marge ciliaire et posent la question de son implication éventuelle dans les programmes génétiques contrôlant la prolifération des cellules souches rétiniennes présentes dans la marge ciliaire. Des analyses de type transcriptome chez les mutants *Otx1*^{-/-} constituent une perspective importante pour la compréhension de ces mécanismes.

RESUMES DES CONFERENCES

21^e Colloque BIOTECHNOCENTRE

23 - 24 Octobre 2008

CONFERENCES

- C1 - Régulation transcriptionnelle du système d'efflux responsable de la résistance multiple aux antibiotiques chez Salmonella**
Sylvie Baucheron.....p27
- C2- GPCRs : couples with many partners**
Joël Bockaert.....p28
- C3 - Inflammation et fibrose pulmonaire**
Isabelle Couillinp29
- C4 - Les gènes Hox : Gènes architectes de l'évolution des animaux.**
Jean Deutsch.....p30
- C5 - La Menin, un oncosuppresseur nucléaire au carrefour de la régulation, de la transcription et de la stabilité du génome**
Patrick Gaudray.....p31
- C6 - Ingénierie du métabolisme végétal : Synthèse de tyrosine et accumulation de vitamine E**
Michel Matringe.....p32
- C7 - Chemical vectors for gene transfer. Nuclear delivery of DNA/polymer complexes**
Patrick Midoux.....p33
- C8 - Hepatitis C virus and lipid droplets.**
Philippe Roingeard.....p34
- C9 - Kinases as therapeutics targets: Control of selectivity in drug design**
Laurent Schio.....p35

C1

Régulation transcriptionnelle du système d'efflux responsable de la résistance multiple aux antibiotiques chez *Salmonella*

Sylvie Baucheron

Equipe Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance
Unité de recherche 1282 Infectiologie Animale et Santé Publique
Inra de Tours - Nouzilly

Les bactéries zoonotiques du genre *Salmonella*, responsables de toxi-infections alimentaires, deviennent de plus en plus résistantes à différentes familles d'antibiotiques thérapeutiques. Les mécanismes de résistance sont l'expression de l'évolution du répertoire génétique des bactéries, en réponse à la pression de sélection exercée par l'usage des antibiotiques. Le mécanisme d'efflux actif, et en particulier la surexpression du système AcrAB-TolC, est responsable de cette résistance multiple. En effet, le transporteur AcrB présente un large spectre de substrats non seulement à différentes classes d'antibiotiques tels que β -lactamines, tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine, rifampicine et quinolones, mais aussi à des substances antimicrobiennes telles que les détergents, les désinfectants, les colorants et les sels biliaires. La sélection de salmonelles multirésistantes dû à l'efflux actif est d'autant plus probable que différentes molécules antimicrobiennes peuvent exercer cette pression.

Une des approches envisagées pour combattre ou limiter l'évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques est de contrer ce mécanisme d'efflux actif. D'une part, l'exploitation des structures à haute résolution des composants protéiques des différents systèmes d'efflux actif existant chez les bactéries ouvre des perspectives de recherche de nouvelles molécules bloquant l'activité de transport des molécules antimicrobiennes par ces systèmes. D'autre part, la maîtrise de leur expression est à envisager.

Cependant, il reste à élucider les mécanismes régulateurs de l'expression de ce système d'efflux chez *Salmonella*. En effet, aucune mutation n'a été mise en évidence dans les loci régulateurs globaux *marRAM* et *soxRS* décrits chez *Escherichia coli*, mais seulement une mutation dans le gène *acrR* codant le répresseur local de l'opéron *acrAB*. La régulation de l'expression de l'efflux, chez *Salmonella*, semble présenter une grande flexibilité puisqu'un activateur supplémentaire, RamA, homologue à MarA, a été identifié. Le gène *ramA* est présent chez *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* mais absent chez *E. coli*. La surexpression de RamA confère le phénotype de résistance multidrogue mais son rôle dans la cascade de régulation reste à préciser. De plus, nous avons identifié dans le génome de *S. Typhimurium* LT2, en amont du gène *ramA*, le gène codant une nouvelle protéine régulatrice, appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels TetR, que nous avons nommé *ramR*. Nos résultats indiquent que le répresseur transcriptionnel RamR contrôle l'expression de RamA, lui-même étant l'activateur de l'expression de AcrAB. L'identification de mutations dans le gène *ramR* et dans la région intergénique *ramR-ramA* de souches résistantes explique la dérégulation dans ces cas.

Notre objectif est maintenant d'approfondir l'étude de la fonction en relation avec la détermination de la structure des protéines RamA et RamR. La détermination de la structure tridimensionnelle à haute résolution de la protéine régulatrice RamR seule, ou en présence d'ADN ou en présence de substrat devrait montrer que la présence d'un ligand (molécule antimicrobienne) induit un changement conformationnel empêchant la protéine de se fixer à l'ADN au niveau du promoteur de *ramA*. La finalité de ce projet est d'identifier des cibles pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques qui éviteraient la surexpression du système d'efflux majeur AcrAB-TolC, voire l'expression d'autres facteurs de résistance ou de virulence potentiellement régulés par RamA.

C2

GPCRs : couples with many partners :

Joël BOCKAERT

CNRS, UMR 5203, Institut de Genomique Fonctionnelle, Montpellier, France, INSERM, U661, Montpellier, F-34094 France, Universite Montpellier F-34094 France

Among membrane-bound receptors that recognize regulatory messages (hormones, neurotransmitters, photon, odours, etc.) the seven transmembrane receptors (7 TM) coupled to G proteins (GPCRs) are the most numerous. They represent 3% of the total number of genes in human genome. They have similar 3D structure but can be grouped into 8 classes that share few sequence similarities. GPCRs are targets for more than 50% of the drugs used in therapy.(1)

The classical view of GPCR/G protein coupling stoichiometry was one receptor for one G protein. This is no longer the case. The importance of GPCR dimerization has been well documented for class 3 GPCRs. These receptors, including mGluRs and the Ca²⁺-sensing receptor, are homodimers, GABA_B receptors are obligatory heterodimers. This latter receptor is constituted of two 'subunits' sharing no sequence similarity (GABA_BR1 and GABA_BR2). GABA_BR1 bind GABA and is not able to activate the G protein, whereas GABA_BR2 does not bind GABA and is coupled to G protein. GABA_BR2 is required for GABA_BR1 to reach the cell surface. In class1 GPCRs, the general view is also that they form dimers and that 2 GPCR subunits interact with one G protein. However, the exact functional importance of the dimerization of class1 GPCR is still a matter of debate. Indeed, a single class1 GPCR subunit is able to activate the G protein. The dimerization may assure a better coupling efficacy or a better trafficking to the membrane. Finally, two pharmacologically different class1 GPCRs subunits or even a class1 GPCR subunit and a class 3 GPCR subunit can form hetero-dimers. Such an hetero-dimer has been recently reported composed of one 5-HT_{2A} receptor subunit and one metabotropic (mGluR2) receptor subunit. GPCRs are not only interacting with heterotrimeric G proteins but also with accessory proteins called GPCR-interacting proteins (GIPs) (2,3). GPCRs and GIPs formed large complex receptosomes. GIPs are implicated in GPCR targeting to specific cellular compartments, in their trafficking to and from the membranes as well in fine tuning of their signalling properties. We have used a proteomic approach for searching GIPs associated with 5-HT receptors and metabotropic glutamate receptors (mGluRs). I will present examples of the roles of some GIPs in cellular functions (4) as well as in general physiology. In particular I will discuss the role of PDZ proteins such as PSD-95 in the 5-HT_{2a} receptor control of neuropathic pain and the role of the mGluR7-PDZ protein PICK-1 association in absence epilepsy (5).

1- Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999;18(7):1723-9.

2- Bockaert J, Dumuis A, Fagni L, Marin P. GPCR-GIP networks: a first step in the discovery of new therapeutic drugs? *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2004 7 649-57

3-Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther.* 2004 103:203-21.

4-Gavarini S, Bécamel C, Altier C, Lory P, Poncet J, Wijnholds J, Bockaert J, Marin P. Opposite effects of PSD-95 and MPP3 PDZ proteins on serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor desensitization and membrane stability. *Mol Biol Cell.* 2006 17 4619-31

5-Bertaso F, Zhang C, Scheschonka A, de Bock F, Fontanaud P, Marin P, Haganir RL, Betz H, Bockaert J, Fagni L, Lerner-Natoli M. PICK1 uncoupling from mGluR7a causes absence-like seizure. *Nat Neurosci.* 2008 11:940-8

C3

Inflammation et fibrose pulmonaire

Isabelle Couillin UMR-IEM6218, CNRS Université d'Orléans, Orléans

Les maladies interstitielles du poumon telles que la fibrose pulmonaire sont en augmentation constante et représentent un problème majeur de santé publique. De nombreuses maladies pulmonaires sont caractérisées par une fibrose comme l'asbestose/amiantose, la silicose, le poumon du fermier, la sarcoïdose, les maladies de métiers exposés à l'inhalation de petites particules minérales ou organiques. Des médicaments puissants, des poisons, la radiothérapie au niveau de la poitrine, les gaz industriels peuvent également provoquer la formation de lésions pulmonaires. Ces lésions conduisent à une incapacité respiratoire fatale et contre laquelle il n'existe actuellement aucune thérapie. Dans 50% des cas, la fibrose pulmonaire est d'origine inconnue et est alors appelée fibrose pulmonaire idiopathique. Cette dernière est modélisée chez la souris par l'administration dans les voies respiratoires d'un agent toxique, la bléomycine qui lèse les cellules du tissu pulmonaire entraînant une réponse immunitaire inflammatoire et des processus de réparation tissulaire excessifs qui conduisent à une fibrose pulmonaire. Nous avons recherché les récepteurs cellulaires impliqués dans la mise en place des réponses inflammatoires, de réparation et de fibrose et également les molécules libérées par les cellules des tissus pulmonaires altérés capables d'activer ces récepteurs. Nous avons ainsi mis en évidence le rôle fondamental de l'IL-1 β et de la voie de signalisation IL-1R1/MyD88 dans la réponse inflammatoire et la fibrose pulmonaire. Les mécanismes conduisant à la production d'IL-1 β suite à l'endommagement des cellules pulmonaires sont en cours d'étude. Ces résultats nous permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette pathologie et contribuent à l'identification de cibles thérapeutiques de la fibrose pulmonaire idiopathique.

C4

Les gènes Hox :**Gènes architectes de l'évolution des animaux.**

Jean Deutsch, Professeur Émérite, Université P & M Curie (Paris 6), UMR 7622 « Biologie du Développement ».

En 1894, William Bateson définit « *l'homéose* » comme une transformation d'une partie du corps d'un animal en une autre. Dans les années 1950 à 80, Ed Lewis isole plus d'une centaine de mutants de la drosophile présentant une transformation homéotique du thorax ou de l'abdomen. Il montre que les gènes correspondants sont groupés en un complexe. En 1984, Scott et Wiener et McGinnis et autres découvrent indépendamment que des gènes homéotiques de la drosophile possèdent un motif commun, *l'homeobox*. Très vite, ce motif est retrouvé dans des gènes d'animaux divers, y compris chez les mammifères, dont l'espèce humaine. Les gènes Hox constituent donc une famille de gènes répandue dans l'ensemble du règne animal. De manière tout à fait inattendue, on découvre alors que les mutations de ces gènes Hox produisent aussi des transformations homéotiques chez la souris.

Aujourd'hui, la présence de gènes Hox est attestée chez la plupart des phylums des métazoaires, sauf chez les éponges. Chez les animaux à symétrie bilatérale, les Bilatériens, les gènes Hox sont très souvent groupés en un complexe. Il est probable que cette organisation génomique est ancestrale chez les Bilatériens.

Le rôle homéotique des gènes Hox, conservé au cours de l'évolution des Bilatériens a conduit McGinnis et Kuziora à les qualifier de « gènes architectes » du développement. Sans être en eux-mêmes des gènes de morphogenèse, ils contrôlent ces derniers et organisent les différences anatomiques le long de l'axe antéro-postérieur (A-P) chez les Bilatériens. Des modifications dans le répertoire des gènes Hox, dans leur profil d'expression ou dans la séquence-même de ces gènes ont pu être mises en relation avec des changements de morphologie au cours de l'évolution. Ainsi, au cours de l'évolution des Arthropodes : la perte de l'abdomen chez les cirripèdes est corrélée avec la perte du gène Hox *abdominal-A* (*abdA*) ; la présence de pattes-mâchoires chez les crustacés est en relation avec des changements de profil d'expression du gène Hox *Ultrabithorax* (*Ubx*). La perte des pattes abdominales chez les insectes est en rapport avec des changements de la séquence codante du gène *Ubx*.

Il ne fait aucun doute que la découverte des gènes Hox et de leur rôle a profondément changé notre conception du développement comparé des animaux et de leur évolution depuis une vingtaine d'années.

C5

La Menin, un oncosuppresseur nucléaire au carrefour de la régulation, de la transcription et de la stabilité du génome

Patrick GAUDRAY, directeur de recherche CNRS, membre du comité consultatif national d'éthique, GICC
CNRS UMR 6239, Tours

La néoplasie endocrine multiple de type 1 (MEN1) correspond à un syndrome de prédisposition monogénique hérité comme un trait dominant qui affecte une variété de tissus endocriniens, en particulier les parathyroïdes, le pancréas endocrine et l'hypophyse antérieure. Elle est causée par des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *MEN1* qui inactivent la Menin, la protéine pour laquelle il code. Bien que les souris modèles "knock-out" démontrent que l'absence totale de Menin est létale au stade embryonnaire, et que les souris hétérozygote développent des tumeurs de la même façon que l'homme, la fonction de la Menin demeure inconnue. La Menin est probablement impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose par le biais de sa participation à la dynamique fonctionnelle de la chromatine et la régulation de la transcription. En outre, des travaux de génétique ont impliqué la Menin dans le maintien de l'intégrité des génomes. Toutefois, le rôle de la Menin ne s'arrête pas là. Elle joue de nombreux rôles dans le contrôle de la vie cellulaire et de sa normalité, bien au-delà de l'oncogenèse endocrine, ce qui rend peu probable que la fonction de la Menin puisse n'être déchiffrée que par la génétique.

Nous avons montré que l'expression de deux gènes étroitement liés à la voie oncosuppressive de p53 est altérée *in vitro* après atténuation de l'expression de Menin (knock-down). CDKN1A (p21) était surexprimé tandis que l'expression de TP53BP2 était supprimée. En outre, nous avons montré que la Menin jouait un rôle répresseur sur l'activation du promoteur de CDKN1A par p53.

Menin co-purifie avec la protéine p53, en particulier suite à des dommages à l'ADN. L'interaction entre les deux protéines semble être renforcée par acétylation de p53, en particulier sur la lysine 320. L'enzyme responsable de cette modification, l'histone acétyltransférase PCAF semble également capable d'interagir avec la Menin. Il est donc possible que des régulateurs de l'acétylation de p53 soient impliqués dans l'inhibition par Menin de la transcription CDKN1A activée par p53.

Nos résultats mettent en lumière le rôle que pourrait exercer Menin dans le choix entre l'arrêt de la croissance et l'apoptose en réponse à un stress génotoxique.

C6

**Ingénierie du métabolisme végétal :
Synthèse de tyrosine et accumulation de vitamine E**

Michel Matringe
INRA Grenoble

Du fait de leur caractère sédentaire, les plantes produisent une infinité de métabolites secondaires, qui leur permettent de s'adapter à leur environnement et de se défendre contre leurs agresseurs. Ces molécules ont de tout temps joué un rôle important pour l'homme, tant du point de vue nutritionnel et pharmacologique que technologique. L'avènement de nouveaux outils biotechnologiques a considérablement élargi le champ d'application de l'ingénierie métabolique. L'un des enjeux majeur est d'arriver à détourner une fraction importante des ressources de la cellule vers les voies métaboliques ciblées afin d'accumuler en fortes quantités les produits d'intérêt.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à la synthèse de Vitamines E, synthétisées à partir de tyrosine et de géranylgeranylpyrrophosphate, uniquement par les organismes photosynthétiques. Nous nous sommes demandé quel impact pouvait avoir la régulation de la synthèse de tyrosine sur l'accumulation de vitamine E dans la plante. Nous avons montré que la sensibilité à la tyrosine de l'arogénate déshydrogénase, qui catalyse la dernière étape de la synthèse de la tyrosine, est un élément déterminant dans la dérégulation de la synthèse de la tyrosine et dans l'augmentation du contenu en vitamines E de la plante.

C7

**Chemical vectors for gene transfer.
Nuclear delivery of DNA/polymer complexes**

Patrick Midoux
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301
Orléans

Plasmid DNA/cationic polymer complexes (so called polyplexes) are attractive non viral gene delivery systems for gene therapy applications. Although the mechanisms of transfection by polyplexes are still not completely understood, it is assumed that the delivery of plasmid DNA (pDNA) in the nucleus of the targeted cells for gene expression requires polyplex capture, internalization, pDNA endosome escape and pDNA nuclear import. Considerable efforts have been made to overcome these important intracellular barriers. Polyethylenimine (PEI) contains primary amines that allow pDNA condensation, protection against nuclease digestion and enhancement of cellular uptake. PEI also possesses protonable amines in an acidic medium favouring pDNA endosome escape. We have developed histidylated polylysine (HIS) that contains acid-protonable imidazole groups that also favour pDNA endosomal escape (Pichon *et al.*, 2001). We designed an optimized extended DNA κ B site (termed 3NF) and inserted it in pDNA encoding the luciferase gene (p3NF-luc-3NF).

Here, we present current reports related to the entry mechanisms and intracellular routing of polyplexes. We also report recent data showing that the insertion of the 3NF motifs in the nucleic acid sequence of pDNA provides an increase of the plasmid import into the nucleus. Confocal Laser Scanning Microscopy was used to quantitate the number of pDNA copies in the nucleus in cells transfected with IPEI and HIS (Breuzard *et al.*, 2008). Moreover, we visualized for the first time in living cells the passage of pDNA through the nuclear pore. The studies were conducted by real-time confocal laser scanning microscopy. FRET and FRAP methods were carried out to investigate whether the pDNA was still condensed with the polymer in the nucleus. Upon 5h transfection, the nuclear amount of p3NF-luc3NF was ~1500 copies whereas that of the 3NF-free counterpart pDNA was less than 250. The quantity of p3NF-luc-3NF dropped dramatically in the presence of the BAY 11-7085, an inhibitor of NF κ B activation. These data strongly support a nuclear import of p3NF-luc3NF mediated by NF κ B. Moreover, FRET experiments clearly revealed that most of nuclear pDNA was still condensed with the polymer. The FRET method was carried out in cells expressing a GFP-tagged protein of the nuclear pore complex to demonstrate pDNA passage through the nuclear pore.

Our results strongly indicate that at the cellular level, high amount of a pDNA bearing optimized κ B motif is able to be delivered through the nuclear pore in the cell nucleus. Most importantly, p3NF-luc-3NF construct bearing promoted a sustained *in vivo* gene expression.

Pichon C et al (2001) *Adv. Drug Delivery Rev.* **53**, 75-94 .

Breuzard G et al (2008) *Nucleic Acids Res.* Jul;36(12):e71.

C8

Hepatitis C virus and lipid droplets.

Philippe Roingeard

INSERM ERI 19, Université François Rabelais & CHRU de Tours.

Web: <http://espri3856.med.univ-tours.fr/>

E-mail: roingeard@med.univ-tours.fr

Hepatitis C virus (HCV) has a major impact on public health, with an estimated 170 million infected individuals worldwide. HCV infection is a major cause of chronic liver disease: more than 50% of individuals exposed to HCV develop chronic hepatitis and 20 % of chronically infected individuals develop cirrhosis. HCV infection is also a major cause of hepatocellular carcinoma and the primary reason for liver transplantation in Western Europe and the United States. No vaccine protecting against HCV infection has yet been developed, and current antiviral strategies are of limited efficacy and have major side effects. HCV is a small enveloped RNA virus belonging to the Flaviviridae family, genus *Hepacivirus*. This virus is highly heterogeneous and has been classified into six major genotypes and numerous subtypes.

Lipid droplets are intracellular storage organelles found in all eukaryotic organisms. They consist of a core of neutral lipid, comprising mainly triacylglycerols and/or cholesterol esters, surrounded by a monolayer of phospholipids. These intracellular organelles are involved not only in lipid storage, but also in cell signalling and the regulation of intracellular vesicular trafficking. Recent basic studies have suggested that interactions between HCV core protein and lipid droplets are required for the HCV infection cycle. In infected cells, the HCV core protein is associated with the surface of lipid droplets and the endoplasmic reticulum membranes closely surrounding these droplets, and its self-assembly drives virion budding. This interaction also seems to be directly linked to a virus-induced steatosis, which involves the deposition of triglycerides in the liver and contributes to the progression of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Many clinical studies have reported that virus-induced steatosis is significantly more severe with HCV genotype 3 than with other genotypes, and this phenomenon has been modelled in recent basic studies based on the production of HCV core proteins of various genotypes *in vitro*. The association of HCV core protein with lipid droplets seems to play a central role in HCV pathogenesis and morphogenesis, suggesting that virus-induced steatosis may be essential for the viral life cycle.

C9

**Kinases as therapeutics targets:
Control of selectivity in drug design**

*Laurent Schio*¹, *Cécile Combeau*², *Anke Steinmetz*³, *Nicolas Baurin*³

¹*sanofi-aventis, Oncology Medicinal Chemistry, 94400 Vitry-sur-Seine – France*

²*sanofi-aventis, Oncology Molecular Exploratory Research, 94400 Vitry-sur-Seine – France*

³*sanofi-aventis, In Silico Sciences, 94400 Vitry-sur-Seine – France*

The current decade has been the advent of kinase inhibitors as therapeutics drugs for the treatment of cancer. Recently, Sutent® (sunitinib) in gastrointestinal stromal tumors (GIST) and Sprycel™ (dasatinib) in chronic myeloid leukemia (CML), have followed the breach opened by Gleevec® (imatinib) launched in 2001 for the treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) CML and in 2002 for the treatment of patients with Kit-positive unresectable and/or metastatic malignant GIST. Overall, a dozen of anticancer kinase inhibitors have received FDA approval during the last five years and the market for this class of drugs is expected to reach \$58.6 billions in 2010.

The development of the targeted therapy concept in Oncology as well as the clinical demand for much better tolerated treatments have conducted research programs in pharmaceutical companies towards the discovery of selective kinase inhibitors. On the other hand, the search for potent enough inhibitors in pharmacological models as well as the economical benefit for multi-indication drugs has led pharmaceutical companies to develop tools and strategies to control and modulate kinase selectivity of inhibitors in drug discovery programs.

INDEX DES AUTEURS

21^e colloque BIOTECHNOCENTRE

23 – 24 Octobre 2008

Les auteurs sont classés par ordre alphabétique et les numéros indiqués correspondent aux numéros de poster.

<i>Aucagne, 5, 17</i>	<i>El Hafny- Rahbi, 11</i>	<i>Midoux, C7</i>
<i>Asseline, 3</i>	<i>El Hmouzi, 7</i>	<i>Mitterrand, 15</i>
	<i>Erard, 18</i>	<i>Monsigny, 21</i>
<i>Baranger, 1</i>		<i>Moreau, 1</i>
<i>Barra, 19</i>	<i>Fick, 6</i>	
<i>Barta, 17</i>	<i>Fonteneau, 21</i>	<i>Noulin, 6</i>
<i>Bauchart, 19</i>		
<i>Baucheron, C1</i>	<i>Garipova, 21</i>	<i>Oudin, 9</i>
<i>Belghazi, 14</i>	<i>Gasse, 8</i>	
<i>Belleannée, 14</i>	<i>Gaudray, C5</i>	<i>Petrilli, 8</i>
<i>Boccaccio, 21</i>	<i>Germon, 12</i>	<i>Piller F., 2</i>
<i>Bockaert, C2</i>	<i>Gilot, 19</i>	<i>Piller V., 2</i>
<i>Boichot, 6</i>	<i>Grillon, 15, 20</i>	<i>Porcheron, 19</i>
<i>Bounaix, 4</i>	<i>Guénon, 6</i>	
<i>Bourgeaux, 2</i>	<i>Guibert, 10</i>	<i>Quesniaux, 6, 8, 13, 18</i>
<i>Bousser, 21</i>	<i>Guirimand, 9</i>	
<i>Boysen, 7</i>	<i>Guizani, 10</i>	<i>Renard, 3</i>
<i>Briault, 13</i>		<i>Riteau, 8</i>
<i>Bromet, 4</i>	<i>Helene, 11</i>	<i>Rocancourt, 22</i>
<i>Bromet-Petit, 4</i>	<i>Helloin, 12</i>	<i>Roche, 21</i>
<i>Bureaud, 2</i>	<i>Hérault, 13</i>	<i>Roingeard, C8</i>
<i>Burlat, 9</i>		<i>Rouquet, 19</i>
	<i>Jacques, 12</i>	<i>Ryffel, 6, 8, 18</i>
<i>Cadène, 5</i>	<i>Jotereau, 21</i>	
<i>Cardot, 4</i>		<i>Schio, C9</i>
<i>Chanteloup, 19</i>	<i>Kieda, 11, 13, 15, 20</i>	<i>Schnyder, 6, 18</i>
<i>Couillin, 6, 8, 18, C3</i>		<i>Sélo, 20</i>
<i>Courdavault, 9</i>	<i>Labas, 1, 14</i>	<i>Slugocki, 12</i>
<i>Cremer, 2</i>	<i>Lagente, 6, 8</i>	<i>Srinivas, 21</i>
	<i>Lalmanach, 5</i>	<i>Storset, 7</i>
<i>Dacheux F., 14</i>	<i>Lamerant, 15</i>	<i>ST-Pierre, 9, 10</i>
<i>Dacheux J-L., 14</i>	<i>Lamiable, 16</i>	<i>Szczepanek, 15</i>
<i>Dallet-Choisy, 1</i>	<i>Landon, 5</i>	<i>Szymkowski, 18</i>
<i>Decoville, 16</i>	<i>Larrieu, 21</i>	
<i>Delmas, 2, 5, 17</i>	<i>Laurent, 7</i>	<i>Triki, 10</i>
<i>Derache, 5</i>	<i>Le Bert, 6</i>	<i>Tschopp, 8</i>
<i>Destouches, 15</i>	<i>Lelièvre, 17</i>	
<i>Deutsch, C4</i>	<i>Locker, 16</i>	<i>Villar-Cheda, 22</i>
<i>Dobrindt, 19</i>		
<i>Doz, 6</i>	<i>Matringe, C6</i>	<i>Zani, 1</i>
<i>Drouet, 7</i>	<i>Mazan, 15, 22</i>	
<i>Ducos, 10</i>	<i>Menuet, 22</i>	
<i>Duverger, 21</i>	<i>Mercier, 18</i>	
	<i>Meudal, 5</i>	