



Journée Scientifique du CRNH Auvergne

Pôle Physique des Cézeaux, 3 décembre 2008

Organisation : Denis Ardid, Didier Attaix, Noël Cano, Jean-Michel Chardigny, Véronique Coxam,
Jean-Marc Lobaccaro, Josyane Moinard, Marie-Paule Vasson

PROGRAMME

8:00 Accueil, installation des posters

9:00 Introduction

9:10-10:15 Tractus gastro-intestinal (A Bernalier)
Introduction 10 min

- CO1 Involvement of acid-sensing ion channels and nerve growth factor in colonic hypersensitivity induced by butyrate in rats
Matricon J, Gelot A., Busserolles J., Bourdu S., Etienne M., Eschalier A., Lazdunski M. & Ardid A.
- CO2 Développement et potentialités de nouveaux systèmes *in vitro* simulant le tractus digestif humain
Denis S, Pons E, Blanquet-Diot S. et Alric M.
- CO3 Impact du microbiote intestinal d'individus atteints de troubles fonctionnels intestinaux sur la réponse immunitaire intestinale.
Goibert A.P., Del'Homme C., Garraud K., Kémény J.L., Dapoigny M, Bernalier-Donadille A.

10:15 - 10 :45 pause

10:45-12:15 Cancers hormono-dépendants (MP Vasson)
Introduction 10 min

- CO4 Étude de l'impact des phyto-oestrogènes du soja sur la voie ER β dans des cellules tumorales mammaires mutées ou non pour *BRCA1*
Aubel C, Privat M, Arnould S, Ferrara M, Bernard-Gallon D, Bignon YJ
- CO5 LXR, Cholestérol et cancer de prostate
Pommier A, Alves G, Mouzat K, Viennois E, Sion B, Marceau G, Communal Y, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM
- CO6 La Zinc- α 2-glycoprotéine: expression d'une nouvelle adipokine au niveau des cellules cancéreuses mammaires et recherche de corrélations
Delort L, Dubois V, Jardé T, Mishellany F, Penault-Llorca F, Vasson MP, Caldefie-Chézet F
- CO7 Effet *in vitro* de l'arginine sur la prolifération, la survie et la cytotoxicité de la lignée cellulaire NK-92
Lamas B, Vergnaud-Gauduchon J, Perche O, Goncalves-Mendes N, Rougé S, Vasson MP, Farges MC

12:30 - 14:00 buffet-posters

14:00-15:05 Pathologie dégénérative cardiovasculaire (A Mazur)

Introduction 10 min

- CO8 Etude des mécanismes d'action des effets antiathérogènes du curcumin chez la souris déficiente en apolipoprotéine E
Coban D
- CO9 Impact des anthocyanes de myrtille sur le transcriptome hépatique de souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE -/-)
Mauray A; Milenkovic D; Besson C; Chauvet S; Scalbert A; Mazur A; Felgines C
- CO10 L'étude clinique Trans-Insulin et les cultures de myocytes montrent que les acides gras trans d'origines laitière et industrielle n'altèrent pas la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique.
Tardy AL, Lambert- Porcheron S, Malpuech-Brugère C, Cheraiti N, Giraudet C, Rigaudière JP, Laillet B, LeRuyet P, Peyraud JL, Laville M, Michalski MC, Chardigny JM, Morio B

15:05 - 15:30 pause

15:30-17:00 Tissus osseux et musculaire (Y Boirie)

Introduction 10 min

- CO11 Inhibition de l'ostéoclastogénèse dépendant de RANKL: Rôle du glucose
Wittrant Y, Gorin Y., Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, Abboud-Werner SL
- CO12 Les processus protéolytiques ubiquitine protéasome dépendant et apoptotiques mitochondriaux sont séquentiellement normalisés pendant la récupération musculaire après immobilisation
Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Béchet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D, Combaret L
- CO13 Etude du rôle signal de la leucine sur la différenciation des cellules satellites musculaires.
Averous J, Dardevet D
- CO14 Sensibilité à l'insuline et synthèse protéique musculaire : les céramides, un ennemi commun
J. Salles, N. Tardif, C. Giraudet, P. Rousset, C. Migne, V. Patrac, C. Guillet, J-M. Chardigny, Y. Boirie, S. Walrand

Membres du CRNH : Réunion par axe thématique à 17h15

POSTERS

Tractus gastro-intestinal (A Bernalier, D Ardid)

- P1 Homofermentation of dietary carbohydrates into butyrate by a gnotobiotic rat model associating *Roseburia intestinalis* and a H₂-utilising acetogen.
Del'Homme C., Garraud K., Delmas E., Chassard C. & Bernalier-Donadille A.
- P2 Impact of the administration of the H₂-utilising acetogen, *ruminococcus hydrogenotrophicus*, on the structure and metabolism of the intestinal microbial community in human microbiota-associated rat.
Del'Homme C., Gaudichet C., Leblond Y. and Bernalier-Donadille A.
- P3 Comparaison de l'activité xylanolytique de deux espèces bactériennes majeures du colon humain: *Bacteroides xylanisolvens* et *Roseburia intestinalis*
Mirande C., Kadlecikova E., Bernalier-Donadille A., Forano E., Béra-Maillet C.
- P4 Succinate production from inulin fermentation by the intestinal microbiota of conventional rats receiving inulin- or chicory-enriched diet
Marquet A, Jacobs H., Moundras C., Demigné C., Bernalier-Donadille A.
- P5 Diversification de la flore méthanogène colique et forte prévalence d'un nouvel ordre d'Archées méthanogènes chez les personnes âgées
Mihajlovski A, Dore J, Alric M, Brugère JF

Cancers hormono-dépendants (F Caldefie-Chezet, JM Lobaccaro)

- P6 Les adipokines jouent-elles un rôle dans le développement du cancer du sein en situation d'obésité ?
Jardé T, Caldefie-Chézet F, Goncalves-Mendes N, Delort L, Buechler C, Vasson MP
- P7 Evaluation du pouvoir anticancéreux de différentes huiles essentielles extraites de plantes de la flore ivoirienne
Koffi M, Delort L, Ruiz N, Goulollaly T, Gameiro L, N'Guessan Y, Chalard P, Vasson MP, Chalchat JC, Caldefie-Chézet F
- P8 Rôle de *BRCA1* dans la réponse de cellules tumorales mammaires au traitement par la génistéine
Privat M., Aubeil C, Arnould S, Bernard-Gallon D., Ferrara M, Bignon YJ.
- P9 Du cancer hormono-dépendant de la prostate à la création d'Oncodiag
Rabiau N, Souiller H, Duplant S, Dauplat J, Bignon YJ, Bernard-Gallon D, Dantal Y
- P10 Phyto-Œstrogènes du Soja et Cancer du Sein : Inhibition des Oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* par la Technique d'Interférence ARN
Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon D
- P11 Prévention nutritionnelle du cancer de la prostate : Effets des micro-constituants de tomates
Talvas J, Gitenay D, Mazur A, Rock E
- P12 GINA : une plate-forme de génotypage haut débit ouverte aux projets auvergnats
Bidet Y, Uhrhammer N, Bignon YJ

Tissus osseux et musculaire (D. Attaix, D. Dardevet)

- P13 Production de glutamate et de CO₂ à partir de glutamine dans des entérocytes isolés incubés de rats adultes et de rats très âgés : étude par ¹³C RMN
Meynial-Denis D, Bielicki G, Beaufrère AM, Mignon M; Renou JP, Patureau Mirand P
- P14 Milk protein fractions differently affect the loss of fat free mass during food restriction in overweight rats
Adéchian S, Sornet C, Bos C, Gaudichon C, Dardevet D, Mosoni L
- P15 Une supplémentation chronique en leucine chez le rat modifie la signalisation de l'insuline dans le muscle sans induire de résistance du transport de glucose.
Balage M; Sornet C; Dupont, J ; Tesseraud, S., Dardevet D
- P16 Nutrition lipidique et stress métabolique lié à l'âge : impact sur la physiologie du tissu musculaire et interactions avec le tissu adipeux.
Barquissau V, Wauquier F, Rousset P, Tardy AL, Davicco MJ, Lebecque P, Wittrant Y, Coxam V, Chardigny JM, Morio B
- P17 Nutrition lipidique et stress métabolique lié à l'âge : impact sur la physiologie du tissu osseux et interactions avec le tissu adipeux.
Wauquier F; Barquissau V, Wittrant Y, Davicco MJ, Lebecque P, Mercier S, Chardigny JM, Morio B, Coxam V
- P18 Impact des polyphénols de l'huile d'olive dans la prévention de l'ostéoporose
Puel, C., Agalias, A., Davicco, M.J., Lebecque, P., Horcajada, M.N., Skaltsounis, AL, Coxam, V.
- P19 La présence d'une inflammation à bas bruit chez le rat âgé n'aggrave pas la perte de masse musculaire induite par une infection
Mayot G, Vidal K, Breuillé D, Blum S, Obléd C, Papet I
- P20 Un régime hyperlipidique/hypercalorique entraîne une diminution de la vitesse de synthèse protéique musculaire, une défaillance du tissu adipeux ?
Tardif N, Salles J, Guillet C, Rousset P, Giraudet C, Patrac V, Migné C, Chardigny JM, Boirie Y, Walrand S

Pathologie dégénérative cardiovasculaire (A Mazur)

- P21 Effet de la consommation d'amidon résistant sur la sensibilité à l'insuline chez le rat soumis à un régime hyperlipidique
Diaz-Rubio M E, Besson C, Dardevet D, Mazur A, Scalbert A, Comte B
- P22 Effet d'un repas enrichi en acides gras trans d'origine animale ou industrielle sur le métabolisme postprandial des lipoprotéines- Etude préliminaire
Mouriou J, Compagnon F, Chardigny JM, Malpuech-Brugère C.
- P23 Food metabolome : Recherche de biomarqueurs d'exposition aux phytomicronutriments et à leurs aliments source
Manach C., Hubert J., LLorach R., Martin J.F., Pujos E., Morand C. Scalbert A
- P24 Stress métabolique induit par un repas hyperlipidique chez l'homme : identification des modifications des métabolites et des protéines plasmatiques
N. Dejeans, J.A. Maier, A. Herosimczyk, T. Sayd, C. Chambon, I. Tauveron, A. Mazur
- P25 Effet des polyphénols sur le développement de l'athérosclérose chez la souris apoE déficiente: étude histologique et transcriptomique
D. Milenkovic, S. Auclair, C. Besson, A. Mazur, A. Scalbert

- P26 Altération de la production du monoxyde de carbone dans des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) déficientes en folates
Herga S, Goux A, Alberto JM, Viala D, Gérard P, Guéant JL, Brachet P
- P27 Modifications du protéome aortique avec l'apport alimentaire en folates chez le rat
Goux A, Chanson A, Gérard N, Herga S, Brachet P
- P 28 Mortalité cardio-vasculaire et exposition à l'arsenic hydrique en Auvergne
Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Sauvart-Rochat MP.
- P 29 Exposition à l'arsenic hydrique dans une cohorte de sujets coronariens
Marie C, Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Fontana L, Lusson JR, Sauvart-Rochat MP
- P 30 Effets de la consommation de pommes plus ou moins riches en polyphénols sur le développement de l'athérosclérose chez des souris apo E-/- : une approche histologique et transcriptomique
Chanet A, Milenkovic D, Auclair S, Besson C, Scalbert A, Mazur A et Morand C

INVOLVEMENT OF ACID-SENSING ION CHANNELS AND NERVE GROWTH FACTOR IN COLONIC HYPERSENSITIVITY INDUCED BY BUTYRATE IN RATS

MATRICON J., GELOT A., BUSSEROLLES J., BOURDU S., ETIENNE M., ESCHALIER A., LAZDUNSKI M. & ARDID A.

*INSERM U766 Pharmacologie de la douleur (Pr Alain Eschalier)
Bâtiment des extensions - Faculté de médecine – 28 pl Henri Dunant – 63 001 C-Fd
julien.matricon@free.fr*

Aim of investigation : Colonic hypersensitivity is one of the major symptom in Irritable Bowel Syndrome (IBS). Based on the fact that butyrate concentrations are increased in IBS-patients, we recently developed a non-inflammatory rat model of chronic colonic hypersensitivity (CHS) induced by butyrate enemas, characterized as a useful novel tool for studying IBS. We hypothesized that butyrate can induce a colonic acidification responsible for CHS colonic hypersensitivity through activation of Acid-Sensing Ion Channels (ASICs). Consequently, the involvement of ASICs and of Nerve Growth Factor (NGF), known to regulate ASICs expression, were investigated in butyrate-treated rats.

Methods : Rats received enemas of a 200mM butyrate solution twice daily for 3 days and colonic hypersensitivity was evaluated at the end of intra-colonic treatment by colo-rectal distension. Distension was after administration of ASIC1A antagonist PcTx1a and after acute or chronic anti-NGF administration. Dorsal spinal cord and lumbo-sacral dorsal root ganglia of butyrate-rats were removed and processed for molecular biology and immuno-histo-chemistry.

Results : Intra-colonic butyrate enemas induced a CHS assessed by a colo-rectal distension score of 45 ± 5.5 mm Hg vs 60 ± 3.5 mm Hg in control rats treated with saline. PcTx1a at the dose of 40 μ g and 80 μ g significantly reversed the distension threshold decrease in butyrate-treated rats (59.5 ± 5.6 mm Hg and 62.7 ± 3.0 mm Hg vs vehicle score respectively, $p < 0.05$). Acute and chronic treatment with anti-NGF significantly reversed the distension threshold decrease in butyrate-treated rats (58.8 ± 0.7 mm Hg and 54.7 ± 6.5 mm Hg vs vehicle score respectively, $p < 0.05$). Immuno-histo-chemistry showed that ASIC1A and ASIC1B are mainly expressed in nociceptors. RT-PCR pointed out an ASIC1A and ASIC1B over-expression in dorsal root ganglia and an ASIC1A and ASIC2B over-expression in dorsal spinal cord. Anti-NGF treatment reversed partially this over-expression.

DEVELOPPEMENT ET POTENTIALITES DE NOUVEAUX SYSTEMES IN VITRO SIMULANT LE TRACTUS DIGESTIF HUMAIN

Sylvain DENIS, Eric PONS, Stéphanie BLANQUET-DIOT et Monique ALRIC
ERT CIDAM.

Université d'Auvergne. Faculté de Pharmacie. 28 place Henri Dunant - BP 38.
63 001 CLERMONT-FERRAND CEDEX 1

sylvain.denis@u-clermont1.fr

L'Équipe de Recherche Technologique n°18 "Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament" travaille à la mise au point d'une nouvelle génération de systèmes *in vitro* de digestion artificielle. Notre but est d'élargir la gamme d'outils existant dans le domaine et de lever les limites technologiques affichées par les anciens systèmes.

L'équipe développe en particulier deux systèmes, l'un simulant la partie haute du tractus digestif et l'autre, la partie basse.

En effet, le premier simule l'environnement luminal de l'estomac et de l'intestin grêle humain, et les mécanismes physico-chimiques qui s'y rapportent. Ce nouvel outil, en cours de validation, intègre des fonctions inédites comme l'arrivée progressive et contrôlée du bol alimentaire dans l'estomac ou la vidange gastrique différentielle, entre liquides et particules solides (ces dernières étant évacuées plus lentement). Le pilotage informatique intégré permet également d'affiner le contrôle du pH et des quantités de sécrétions digestives déversées dans chaque compartiment lors des processus de digestion, en fonction des situations physiologiques ou pathologiques choisies.

Le deuxième système a pour objectif de simuler l'environnement luminal du côlon ascendant, principal siège de la fermentation des produits résiduels non digérés dans l'intestin grêle. Basé sur le principe des bioréacteurs, cet outil robuste, facilement modulable et pilotable, permet le contrôle et/ou le suivi de nombreux paramètres : temps de transit, température, pH, pression, agitation, potentiel d'oxydoréduction, anaérobiose contrôlée et renouvellement de l'atmosphère. La dialyse en continu du milieu permet de réaliser, entre autres, les bilans de production d'acides gras à chaînes courtes en fonction des substrats carbonés.

Ainsi, par leurs potentialités, ces deux systèmes *in vitro* offrent de nouvelles perspectives d'études aussi bien fondamentales qu'appliquées dans les domaines de la nutrition et de la santé humaine.

IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL D'INDIVIDUS ATTEINTS DE TROUBLES FONCTIONNELS INTESTINAUX SUR LA REPONSE IMMUNE INTESTINALE

¹GOBERT AP, ¹DEL'HOMME C, ¹GARRAUD K, ³KEMENY JL,
²DAPOIGNY M et ¹BERNALIER-DONADILLE A.

¹Unité de Microbiologie, UR454, INRA de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint Genès Champanelle

²Service d'Anatomo-pathologie, CHU, Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand.

³Service Hépato-Gastroentérologie, Hôtel Dieu, 63000 Clermont Ferrand

agobert@clermont.inra.fr

Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) représentent une pathologie digestive de prévalence élevée dans les pays occidentaux. Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme ayant un rôle majeur dans la genèse des TFI. Nos travaux récents ont démontré que le microbiote de patients TFI présente une importante dysbiose fonctionnelle affectant divers métabolismes (Chassard *et al*, 2006). Par ailleurs, une infiltration mastocytaire dans les muqueuses coliques et une augmentation de cytokines pro-inflammatoires circulantes (Liebregts *et al*, 2007) ont été rapportées chez des patients TFI. Nous avons donc analysé l'impact du microbiote de patients TFI sur la réponse immunitaire muqueuse intestinale. Des rats Fischer 344/CRL nés axéniques puis inoculés avec les selles de sujets contrôles ou de patients TFI (n = 2) ont été maintenus en isolateurs stériles et ont reçu une alimentation humanisée stérile *ad libitum*. L'implantation du microbiote intestinal a été contrôlée par dénombrements des principaux groupes microbiens (Chassard *et al*, 2008). Trois semaines après inoculation, un groupe de rats a été traité pendant 7 jours par du DSS 4% afin d'induire une inflammation colique. Le côlon a été utilisé pour analyser les dommages histologiques et l'expression des ARNm par PCR en temps réel. Le microbiote intestinal des rats inoculés avec les selles de sujet TFI présente une dysbiose fonctionnelle équivalente à celle observée chez les patients. Les microbiotes des sujets contrôles ou TFI ont induit une maturation du système immunitaire intestinal (sur-expression des ARNm codant pour le TNF- α , l'IFN-g, l'IL-1 β , l'IL-6 et la iNOS) dans la muqueuse colique en comparaison des animaux axéniques ; ces médiateurs pro-inflammatoires ont été néanmoins moins exprimés en présence de microbiote de patients TFI. Une augmentation significative de ces transcrits a été observée dans les côlons de rats traités par le DSS en comparaison des animaux non traités. Cependant l'expression de ces gènes a été significativement moins importante chez les rats à microbiote TFI que chez les rats à microbiote contrôle. Tous les animaux traités par le DSS ont montré une ulcération de la muqueuse et une infiltration leucocytaire, ces lésions étant plus importantes chez les rats à microbiote sain que chez les rats à microbiote TFI. En conclusion, le microbiote de patients atteints de TFI induit moins de réponse immunitaire que celui de sujets sains et possède des propriétés anti-inflammatoires.

ÉTUDE DE L'IMPACT DES PHYTO-OESTROGENES DU SOJA SUR LA VOIE ER β DANS DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES MUTEES OU NON POUR *BRCA1*

AUBEL C, PRIVAT M, ARNOULD S, FERRARA M, BERNARD-GALLON D, BIGNON YJ

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, EA4233 Université d'Auvergne

CBRV 28 place Henri Dunant 63001 Clermont-Ferrand

corinne.aubel@u-clermont1.fr

Dans les pays occidentaux, le cancer du sein constitue un problème de santé publique. Des études épidémiologiques réalisées sur des populations d'origine asiatique laissent entrevoir que les phyto-oestrogènes du soja (e.g. la génistéine) auraient un effet protecteur.

Des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *BRCA1* sont impliquées dans la prédisposition héréditaire au cancer du sein, notre étude vise donc à évaluer l'influence d'un état *BRCA1* muté sur la réponse de cellules tumorales mammaires à la génistéine. Trois lignées de cellules tumorales mammaires (HCC1937, SUM149PT et SUM1315MO2) portant une mutation délétère dans le gène *BRCA1* ainsi que les lignées MDA-MB-231 exprimant une protéine *BRCA1* fonctionnelle et SUM1315 transfectée de manière stable par un plasmide codant pour la protéine *BRCA1* sauvage constituent nos modèles d'étude.

Nous avons montré que la génistéine inhibe de façon plus importante la croissance des cellules tumorales mammaires mutées pour *BRCA1* comparativement aux cellules exprimant une protéine *BRCA1* sauvage. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression du gène *ER β* est augmentée dans les lignées *BRCA1* mutées, ce qui pourrait être une des causes de l'hypersensibilité de ces cellules à la génistéine. Nos résultats laissent entrevoir que la voie ER β pourrait jouer un rôle dans la réponse à la génistéine des cellules tumorales mammaires mutées pour *BRCA1*.

LXR, CHOLESTEROL ET CANCER DE PROSTATE

Aurélien POMMIER^{1,5}, **Georges ALVES**^{1,5}, **Kevin MOUZAT**^{1,5}, **Emilie VIENNOIS**^{1,5},
Benoit SION², **Geoffroy MARCEAU**³, **Yves COMMUNAL**⁴, **Françoise CAIRA**^{1,5},
Silvère BARON^{1,5} et **Jean-Marc A. LOBACCARO**^{1,5}

*UMR GRéD CNRS UMR6247-INSERM U 931-Clermont Université et Centre de Recherche en
Nutrition Humaine - 24, avenue des Landais - 63177 Aubière Cedex-France*

j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

La part croissante occupée par le cholestérol dans les habitudes alimentaires occidentales est associée à une augmentation de l'incidence du cancer de la prostate. Par ailleurs, la diminution du cholestérol circulant par la prise de statine est associée à un faible risque de développer ce cancer. Ces données épidémiologiques posent clairement la question de la place qu'occupe le cholestérol dans le processus de carcinogenèse de la prostate. Le cholestérol est un composant majeur des radeaux lipidiques (rafts), microdomaines localisés dans la membrane cellulaire. Les rafts sont des plateformes de signalisation cellulaire dynamiques impliquées, entre autre, dans le contrôle des voies de survie. En effet, un apport important de cholestérol à des cellules tumorales prostatiques entraîne la coalescence des rafts et une augmentation de la survie cellulaire.

Les Liver X Receptors (LXRs) sont des récepteurs nucléaires existants sous deux isoformes : LXRA et LXRb. Ils sont connus notamment pour activer le transport inverse du cholestérol via le contrôle de l'expression des cassettes ABC. Ce contrôle de l'efflux de cholestérol suggère que les LXRs puissent moduler la survie des cellules tumorales prostatiques.

Nous montrons que le T0901317, agoniste synthétique des LXRs, diminue la quantité de cholestérol intracellulaire via l'augmentation de l'expression d'ABCG1. Cette chute de cholestérol se traduit par la diminution de la phosphorylation de AKT au niveau des rafts puis par l'apoptose des cellules. Par ailleurs, la complémentation en cholestérol s'oppose à la fois la diminution de AKT phosphorylé au niveau des rafts et à l'apoptose des cellules. Ce mécanisme a également été mis en évidence in vivo sur un modèle de xéno greffes sur souris Nude démontrant que 1) le contrôle du pool de cholestérol intracellulaire est une cible d'intérêt pour limiter la survie des cellules tumorales prostatiques ; 2) l'activation des LXRs par des ligands synthétiques représente une piste thérapeutique de première importance

LA ZINC- α 2-GLYCOPROTEINE: EXPRESSION D'UNE NOUVELLE ADIPOKINE AU NIVEAU DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES ET RECHERCHE DE CORRELATIONS

Laetitia DELORT^{1,2}, Virginie DUBOIS^{1,2}, Thierry JARDE^{1,2}, Florence MISHELLANY³, Frédérique PENAULT-LLORCA³, Marie-Paule VASSON², Florence CALDEFIE-CHEZET^{1,2}

1.Laboratoire SVFp.; 2.EA 4233 « Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale », UFR Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont Ferrand ; 3.Laboratoire d'Anatomopathologie, Centre Jean-Perrin, Clermont Ferrand
laetitia.delort@u-clermont1.fr

Introduction : L'obésité est considérée comme un facteur de risque de développement du cancer du sein en particulier chez la femme ménopausée. Le tissu adipeux sécrète des adipokines, notamment la leptine et l'adiponectine, dont la concentration sérique est respectivement augmentée et diminuée en cas d'obésité et qui modèleraient la prolifération de cellules cancéreuses mammaires^{1,2}. La Zinc- α 2-glycoprotéine (ZAG) est une adipokine récemment décrite qui semblerait agir comme un facteur de mobilisation lipidique. Cette adipokine serait surexprimée par certaines tumeurs comme le cancer de la prostate, et pourrait donc être utilisée en tant que marqueur³.

Objectif : L'objectif de cette étude préclinique est de rechercher l'expression de la ZAG dans le tissu mammaire cancéreux.

Matériels et méthodes : L'expression de la ZAG a été recherchée sur des biopsies humaines de tissus mammaires cancéreux provenant de la tumorotheque du Centre Jean-Perrin (carcinome canalaire invasif, n=39) par la technique d'immunohistochimie. Cette technique consiste en l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique de la ZAG et d'un anticorps secondaire marqué à la biotine, permettant la révélation du marquage par la formation du complexe Biotine-Avidine-Peroxydase. La corrélation de Spearman et le test du Chi² ont ensuite été utilisés pour l'analyse statistique des données.

Résultats : L'expression de la ZAG a été détectée au niveau des lésions cancéreuses canalaire invasives et du tissu épithélial sain adjacent (respectivement dans 87% et 94% des cas étudiés). Dans le tissu cancéreux, son expression est corrélée positivement à celle du récepteur à la leptine ($p=0,01$, $r=0,459$) et négativement à celle du récepteur à l'adiponectine R2 ($p=0,03$, $r=-0,371$).

Conclusions : Ces résultats préliminaires suggèrent une relation entre l'expression de la ZAG et celles de la leptine et de l'adiponectine. Des analyses immunohistochimiques complémentaires sont actuellement en cours de réalisation afin d'évaluer l'expression de la ZAG dans d'autres types de cancer du sein.

¹. Caldefie-Chézet F, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005 ; ². Jardé T, *Proc Nutr Soc*, 2008 ; ³. Hale LP, *Clin Cancer Res*, 2001

EFFET IN VITRO DE L'ARGININE SUR LA PROLIFERATION, LA SURVIE ET LA CYTOTOXICITE DE LA LIGNEE CELLULAIRE NK-92

**LAMAS B^(a), VERGNAUD-GAUDUCHON J^(a), PERCHE O^(a), GONCALVES-MENDES N^(a),
ROUGÉ S^(a), VASSON MP^(a,b), FARGES MC^(a)**

^aLaboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, EA4233, UFR de Pharmacie
Université d'Auvergne, CRNH-Auvergne

^bUnité de Nutrition, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand ; CLARA
bruno.lamas@u-clermont1.fr

Introduction : Les cellules Natural Killer (NK), de part leur activité cytotoxique, participent à l'immunité innée et à la vigilance anti-tumorale. L'arginine (Arg), *via* son métabolisme en monoxyde d'azote (NO) ou en ornithine, module les fonctions des cellules NK. Le but de ce travail a été d'explorer les effets d'un apport croissant d'Arg *in vitro* sur les voies métaboliques de cet acide aminé et sur la fonctionnalité des cellules NK-92.

Méthodes : L'expression génique des transporteurs et des enzymes du métabolisme de l'arginine, à savoir les « Cationic Amino-acid Transporteurs » CAT 1, 2A et 2B, l'Arginase I et II, l'Ornithine DéCarboxylase (ODC), l'Ornithine AminoTransférase (OAT), la NO synthase endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS), a été évaluée par RT-PCR sur la lignée cellulaire NK-92 cultivée en conditions standards. La viabilité et la prolifération des cellules cultivées en présence de quantités croissantes d'Arg (0 ; 7,5 ; 15 ; 125 et 200 mg/L) ont été estimées en cinétique (1 fois/jour, 96h) par exclusion au bleu Trypan et la cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles K562-EGFP a été quantifiée par cytométrie en flux. (Moyenne ± DS, Test Kruskal-Wallis suivi d'un test de Newman-Kéuls).

Résultats : Les cellules NK-92 expriment les ARNm de CAT 1, de l'ODC et de l'Arginase I et II. Une concentration de 7,5 mg/L d'Arg protège les cellules NK-92 de la mort cellulaire et s'avère nécessaire et suffisante pour maintenir la prolifération et la survie de ces cellules dès 48h (7,5 mg/L : $2,02 \cdot 10^5 \pm 1,05 \cdot 10^4$ cellules vivantes et $84,5 \pm 1,8\%$ viabilité vs 0 mg/L : $8,9 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^4$ cellules vivantes et $47,5 \pm 2,8\%$ viabilité; $p < 0,05$). De plus, l'Arg potentialise la cytotoxicité des cellules NK-92 de façon dépendante de la concentration à 24h de culture (7,5 mg/L : $5,4 \pm 0,5\%$ vs 0 mg/L : $2,4 \pm 0,5\%$; 15 mg/L : $12,9 \pm 0,9\%$ vs 7,5 mg/L : $5,4 \pm 0,5\%$; $p < 0,05$).

Conclusion : Ainsi, l'Arg exerce un effet stimulant sur la cytoxicité des cellules NK-92 et non sur leur capacité de prolifération. Cette action peut passer par des variations de l'expression génique et/ou de l'activité des récepteurs et des enzymes impliqués dans son métabolisme.

ETUDE DES MECANISMES D'ACTION DES EFFETS ANTIATHEROGENES DU CURCUMIN CHEZ LA SOURIS DEFICIENTE EN APOLIPOPROTEINE E

Dilek COBAN

INRA de Clermont-Ferrand/Theix, Unité de Nutrition Humaine UMR 1019

Equipe Micronutriments, Métabolisme et Santé

63122 Saint-Genès Champanelle

dcoban@clermont.inra.fr

Les polyphénols, une famille de phytom micronutriments, ont un rôle bénéfique sur le risque cardiovasculaire. Cependant, il existe encore peu de données sur un polyphénol particulier, le curcumin. Ce dernier possède pourtant des activités biologiques diverses, touchant de nombreux aspects des processus cellulaires : le stress oxydant, l'inflammation, l'apoptose, réponse auto-immune pour n'en citer que quelques unes.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'impact d'une alimentation enrichie en curcumin sur le développement de maladies cardiovasculaires, de l'athérosclérose en particulier. Des travaux précédents réalisés au sein du laboratoire ont montré chez la souris apoE^{-/-} que le curcumin (0,2% du régime, 4 mois) induisait une diminution de 25% de la taille des plaques d'athérosclérose au niveau de l'aorte. Sur la base de ces résultats, l'objectif de ce travail a été d'étudier les mécanismes qui se mettent en place dans les premières semaines de la supplémentation pour aboutir à cet effet antiathérogène.

Des souris apoE^{-/-} sont réparties en 3 groupes : non supplémenté ou supplémenté avec 0.02% ou 0.2% de curcumin.

Le dosage de biomarqueurs de stress oxydant (isoprostanes) au niveau urinaire et d'inflammation (IL-6 et TNF α) au niveau systémique montre une tendance à diminution de ces fonctions. L'étude de l'expression des ARNm de certains gènes intervenant dans l'activation endothéliale (VCAM-1 et eNOS), le métabolisme lipidique (Acox-1 et Acaca), la phosphorylation oxydative (Ndufb-9) et l'adhérence cellulaire témoigne d'une modulation favorable par le curcumin de ces processus cellulaires mis en jeu lors de l'athérosclérose.

L'ensemble des résultats de cette étude restent préliminaires mais très encourageants et permettent d'orienter les futures recherches selon de nouvelles perspectives.

IMPACT DES ANTHOCYANES DE MYRTILLE SUR LE TRANSCRIPTOME HEPATIQUE DE SOURIS DEFICIENTES EN APOLIPOPROTEINE E (APOE -/-)

MAURAY A, MILENKOVIC D*, BESSON C*, CHAUVET S*, SCALBERT A*, MAZUR A*, FELGINES C**

*INRA–Theix, Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France ;

**Université Clermont 1, 28 place Henri Dunant 63000 Clermont-Ferrand

amauray@clermont.inra.fr

Introduction : Au niveau musculaire, le vieillissement est caractérisé par une diminution de la sensibilité à l'insuline et de la synthèse protéique mais aussi par une augmentation de la quantité de céramides (CER) (données personnelles). L'implication de l'accumulation intramusculaire des CER dans l'insulinorésistance est désormais établie. Le but de notre étude est de vérifier si les CER sont également capables de perturber la synthèse protéique (FSR) musculaire.

Matériels et méthodes : Des cellules C2C12 ont été traitées avec des acides gras capables (palmitate et stéarate) ou non (oléate) d'entraîner une accumulation de CER. La sensibilité à l'insuline a été évaluée par western-blot en dosant avec des anticorps spécifiques l'activation de la protéine Akt, intermédiaire de la voie de signalisation de l'insuline. Le FSR a été mesuré à partir de l'enrichissement en [¹³C₆]phénylalanine dans les protéines des myotubes traités.

Résultats : Des concentrations croissantes de palmitate (0,25 à 0,75mM) induisent une diminution progressive de la sensibilité à l'insuline. En effet, l'activation de la protéine Akt passe de 67 à 37% de la valeur mesurée dans des cellules traitées sans acides gras. Cette inhibition n'est pas retrouvée avec l'oléate et est liée à une accumulation de CER. En présence d'acides gras saturés, le FSR lui aussi subit une diminution dose-dépendante. Une augmentation de la concentration en palmitate de 0,25 à 0,75mM entraîne un déclin du FSR de 71 à 38% de la valeur mesurée dans des cellules témoins. A une concentration de 0,375mM, le palmitate, le stéarate et l'oléate induisent respectivement une diminution de 38, 27 et 11% du FSR. L'inhibition du FSR dépend donc de la qualité des acides gras et potentiellement de l'accumulation des CER. En effet, à cette concentration de palmitate et en présence d'un inhibiteur de la voie de synthèse des CER, la diminution du FSR n'est que de 23%. De plus, la présence d'une faible concentration de CER dans le milieu de culture induit à elle seule une forte diminution du FSR (-39%).

Conclusions : Nos résultats indiquent que les CER inhibent le FSR des cellules musculaires. Avec l'âge, les perturbations du métabolisme et des flux lipidiques pourraient avoir une répercussion double sur les métabolismes glucidique et protéique. (Projet Lip-Age financé par l'ANR).

L'ETUDE CLINIQUE TRANS-INSULIN ET LES CULTURES DE MYOCYTES MONTRENT QUE LES ACIDES GRAS TRANS D'ORIGINES LAITIERE ET INDUSTRIELLE N'ALTERENT PAS LA SENSIBILITE A L'INSULINE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Tardy AL, Lambert- Porcheron S, Malpuech-Brugère C, Cheraiti N, Giraudet C, Rigaudière JP, Laillet B, LeRuyet P, Peyraud JL, Laville M, Michalski MC, Chardigny JM, Morio B

*Unité de Nutrition Humaine - UMR INRA Université d'Auvergne 1019
58, rue Montalembert
63009 CLERMONT-FERRAND Cedex 1
Anne-Laure.Tardy@clermont.inra.fr*

Les principales sources d'acides gras *trans* (AGT) dans l'alimentation sont les huiles végétales partiellement hydrogénées (riches en acide élaidique) et les produits dérivés de ruminants (riches en acide vaccénique). Les études épidémiologiques suggèrent que la consommation chronique d'AGT d'origine technologique pourrait être délétère pour la sensibilité à l'insuline, mais les études d'intervention sur cette question demeurent peu concluantes.

L'objectif de l'étude Trans-Insulin est de comparer l'impact des AGT issus des ruminants ou de la technologie sur la sensibilité à l'insuline du muscle.

Soixante-trois femmes en bonne santé présentant un tour de taille > 88 cm et un indice de masse corporelle > 28 kg/m² ont été recrutées. Après une période d'adaptation, les volontaires ont été randomisées en trois groupes et ont reçu pendant quatre semaines un régime pauvre en AGT (0,54g/jour, n=21), ou un régime enrichi en AGT d'origine laitière (4,86g/day, n=21) ou technologiques (5,58g/jour, n=21). Les modifications de la sensibilité à l'insuline ont été évaluées par un clamp hyperinsulinémique-euglycémique. Par ailleurs, des myotubes en culture ont été utilisés pour estimer la capacité des AGT à contre-balancer la résistance à l'insuline induite par l'acide palmitique.

La sensibilité à l'insuline n'a pas été modifiée après la période d'intervention. Dans les myotubes, les acides vaccénique et élaidique préviennent l'effet délétère de l'acide palmitique sur la phosphorylation d'Akt après stimulation par l'insuline ($p < 0,001$ *versus* acide palmitique).

Ces données démontrent que les AGT d'origines laitière et technologique n'altèrent pas la sensibilité musculaire à l'insuline

Soumis à FASEB J

INHIBITION DE L'OSTEOCLASTOGENESE DEPENDANT DE RANKL: ROLE DU GLUCOSE

**WITTRANT Y, GORIN Y, WOODRUFF K, HORN D, ABOUD HE,
MOHAN S, ABOUD-WERNER SL.**

Centre INRA de Theix – Unité de Nutrition Humaine UMR 1019 – Equipe ASM

Route de Theix

63122 Saint Genès-champanelle

Yohann.wittrant@clermont.inra.fr

L'hyperglycémie est impliquée dans la pathogenèse des maladies osseuses liée au diabète. Cependant, les effets biologiques du glucose sur l'ostéoclastogénèse ne sont pas clairement définis. Dans ce travail, l'effet de concentrations élevées de D(+)glucose et de L(-)glucose (contrôle osmotique) sur l'ostéoclastogénèse induite par RANKL a été étudiée grâce à l'utilisation de la lignée RAW264.7 (précurseurs macrophagiques murins) et de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les cellules ont été exposées, durablement, à des niveaux élevés de glucose afin d'imiter les conditions d'hyperglycémie. La formation ostéoclastique, dans ces cultures, a été analysée à l'aide du dosage de l'activité Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRACP), de l'expression des transcripts du récepteur de la calcitonine (CTR) et la cathepsine K. En parallèle, l'analyse de l'activité ostéoclastique a été focalisée sur (1) production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'utilisation de la sonde fluorescente dichlorodihydrofluorescein diacétate (DCF-DA), (2) l'activation de la caspase-3 (apoptose et différenciation cellulaire), (3) l'activité du facteur de transcription Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) et (4) la migration cellulaire. Les résultats montrent, pour la première fois, qu'une concentration élevée de D(+)glucose inhibe la formation des ostéoclastes induite par RANKL, ainsi que la production des ROS, l'activité caspase-3 et de la migration cellulaire par le biais d'une voie métabolique. Les résultats suggèrent également que le D(+)glucose inhibe la formation des ostéoclastes induite par RANKL via une diminution de la production des ROS et de l'activité redox-sensible du NF- κ B. Cette étude contribue à comprendre le rôle de la glycémie dans les maladies osseuses associées au développement du diabète. Les données suggèrent que les niveaux élevés de glucose peuvent modifier le remodelage osseux en diminuant la différenciation et de la fonction des ostéoclastes.

LES PROCESSUS PROTEOLYTIQUES UBIQUITINE PROTEASOME DEPENDANT ET APOPTOTIQUES MITOCHONDRIAUX SONT SEQUENTIELLEMENT NORMALISES PENDANT LA RECUPERATION MUSCULAIRE APRES IMMOBILISATION

**Emilie VAZEILLE, Audrey CODRAN, Agnès CLAUSTRE, Julien AVEROUS,
Anne LISTRAT, Daniel BECHET, Daniel TAILLANDIER,
Dominique DARDEVET, Didier ATTAIX et Lydie COMBARET**
*UNH, Equipe Protéolyse
INRA de Theix
63 122 Ceyrat
vazeille@clermont.inra.fr*

L'immobilisation induit de profondes altérations morphologiques, physiologiques, et biochimiques au sein du muscle squelettique. Elle est également un facteur aggravant de l'atrophie musculaire et allonge les périodes de convalescence. Dans de nombreuses situations cataboliques, l'atrophie musculaire résulte d'un déséquilibre entre la synthèse protéique et la protéolyse mais également entre les processus de régénération et l'apoptose. L'objectif de ce travail était de caractériser les mécanismes impliqués pendant l'atrophie et la récupération musculaire suite à l'immobilisation en étudiant la régulation de la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante et de l'apoptose mitochondriale. Des rats adultes ont donc été soumis à une immobilisation unilatérale de la patte arrière pendant 4 à 8 jours (I4 à I8). A I8, les animaux ont été déplâtrés et placés en récupération pour une période de 10 à 40 jours (R10 à R40). Pendant l'immobilisation, les muscles gastrocnemius se sont fortement atrophiés. Après déplâtrage, cette atrophie est stabilisée à R10 et ensuite progressivement réduite jusqu'à R40. Les protéines poly-ubiquitinées s'accumulent dès I4 et une augmentation de la vitesse d'ubiquitination et de l'activité chymotrypsine-like du protéasome est observée de I6 à I8. Ces paramètres sont rapidement normalisés, dès R10, lorsque l'atrophie musculaire se stabilise. Les activités de l'apoptosome et des caspase-3 ou -9 cytosoliques sont respectivement augmentées à I6 et I8. Ces activités sont d'abord régulées en dessous des valeurs basales à R15 avant d'être complètement normalisées à R20. Ces données suggèrent donc un processus en deux étapes, où la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante est rapidement activée et normalisée quand le muscle s'atrophie et se stabilise, respectivement, alors que les processus apoptotiques seraient impliqués pendant les phases tardives de l'atrophie et de la récupération musculaire.

ETUDE DU ROLE SIGNAL DE LA LEUCINE SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES SATELLITES MUSCULAIRES

AVEROUS Julien ; DARDEVET Dominique
INRA Clermont-Theix -Unité de Nutrition Humaine
Nutrition et Signaux Protéiques
63122 Ceyrat – France
javerous@clermont.inra.fr

Il est maintenant bien établi que la leucine participe de manière importante au contrôle de la synthèse protéique musculaire, via notamment la régulation des voies de signalisation mTOR et GCN2. En revanche aucune donnée n'existe sur l'effet de la leucine sur un autre paramètre important du maintien de la masse musculaire : le renouvellement des fibres musculaires à partir des cellules satellites. Ce projet vise à déterminer dans quelle mesure la leucine peut réguler les mécanismes de différenciation des cellules satellites. Pour cette étude, deux modèles sont utilisés : la culture primaire de cellules satellites de souris et la lignée myoblastique C2C12. La carence en leucine entraîne une inhibition de la différenciation des cellules satellites en culture primaire ainsi que des cellules C2C12. L'effet de la carence en leucine sur la différenciation apparaît comme relativement précoce, les cellules carencées en leucine ne montrent aucun signe de fusion et ce même après 5 jours de mise en différenciation. Ce défaut de fusion est associé à une absence d'expression de la chaîne lourde de myosine, un marqueur protéique du passage du stade myoblaste au stade myotube. Cet effet est associé à une perturbation de la cinétique d'expression des facteurs MRFs (Myogenic Regulatory Factors) Myf5, MyoD, myogénine et MRF4. Ces facteurs de transcription sont parmi les principaux régulateurs de la différenciation musculaire. Les niveaux protéiques des facteurs Myf5 et MRF4 sont plus élevés dans les cellules carencées. A l'inverse l'expression de MyoD et myogénine est diminuée au cours de la carence. Les travaux en cours visent à déterminer le rôle des voies mTOR et GCN2, ainsi que les mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'expression des MRFs par la carence en leucine.

SENSIBILITE A L'INSULINE ET SYNTHESE PROTEIQUE MUSCULAIRE : LES CERAMIDES, UN ENNEMI COMMUN

J. SALLES, N. TARDIF, C. GIRAUDET, P. ROUSSET, C. MIGNE, V. PATRAC, C. GUILLET, J-M. CHARDIGNY, Y. BOIRIE, S. WALRAND
*UNH, UMR1019, INRA/UdA, Equipe A.M.M.,
58 rue montalembert 63009 Clermont-Ferrand Cedex 1*
Jerome.salles@clermont.inra.fr

Introduction : Au niveau musculaire, le vieillissement est caractérisé par une diminution de la sensibilité à l'insuline et de la synthèse protéique mais aussi par une augmentation de la quantité de céramides (CER) (données personnelles). L'implication de l'accumulation intramusculaire des CER dans l'insulinorésistance est désormais établie. Le but de notre étude est de vérifier si les CER sont également capables de perturber la synthèse protéique (FSR) musculaire.

Matériels et méthodes : Des cellules C2C12 ont été traitées avec des acides gras capables (palmitate et stéarate) ou non (oléate) d'entraîner une accumulation de CER. La sensibilité à l'insuline a été évaluée par western-blot en dosant avec des anticorps spécifiques l'activation de la protéine Akt, intermédiaire de la voie de signalisation de l'insuline. Le FSR a été mesuré à partir de l'enrichissement en [¹³C₆]phénylalanine dans les protéines des myotubes traités.

Résultats : Des concentrations croissantes de palmitate (0,25 à 0,75mM) induisent une diminution progressive de la sensibilité à l'insuline. En effet, l'activation de la protéine Akt passe de 67 à 37% de la valeur mesurée dans des cellules traitées sans acides gras. Cette inhibition n'est pas retrouvée avec l'oléate et est liée à une accumulation de CER. En présence d'acides gras saturés, le FSR lui aussi subit une diminution dose-dépendante. Une augmentation de la concentration en palmitate de 0,25 à 0,75mM entraîne un déclin du FSR de 71 à 38% de la valeur mesurée dans des cellules témoins. A une concentration de 0,375mM, le palmitate, le stéarate et l'oléate induisent respectivement une diminution de 38, 27 et 11% du FSR. L'inhibition du FSR dépend donc de la qualité des acides gras et potentiellement de l'accumulation des CER. En effet, à cette concentration de palmitate et en présence d'un inhibiteur de la voie de synthèse des CER, la diminution du FSR n'est que de 23%. De plus, la présence d'une faible concentration de CER dans le milieu de culture induit à elle seule une forte diminution du FSR (-39%).

Conclusions : Nos résultats indiquent que les CER inhibent le FSR des cellules musculaires. Avec l'âge, les perturbations du métabolisme et des flux lipidiques pourraient avoir une répercussion double sur les métabolismes glucidique et protéique. (Projet Lip-Age financé par l'ANR)

POSTERS

HOMOFERMENTATION OF DIETARY CARBOHYDRATES INTO BUTYRATE BY A GNOTOBIOTIC RAT MODEL ASSOCIATING ROSEBURIA INTESTINALIS AND A H₂-UTILISING ACETOGEN

**DEL'HOMME C., GARRAUD K., DELMAS E.,
CHASSARD C. and BERNALIER-DONADILLE A.**

*Inra, Unité de Microbiologie, UR454, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix,
63122 Saint Genès-Champanelle, France.*

bernal@clermont.inra.fr

In the human gut, the biotransformation of polysaccharides into fermentative end-products (short chain fatty acids and gases) requires contribution of different functional groups of microorganisms linked by various inter-species interactions. In a course of studies of these bacterial interactions, H₂ and acetate co-transfers were evidenced in vitro between the H₂-producing fibrolytic species *Roseburia intestinalis* and the H₂-utilizing acetogen, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*. This co-transfer further led to homo-fermentation of xylan into butyrate, *R. intestinalis* co-metabolizing xylan and acetate to form butyrate. The objective of this study was to investigate how this bacterial interaction could be reproduced in vivo in gnotobiotic rats. Axenic animal were inoculated with *R. intestinalis* (10⁹ / ml). After a 15 days period, half of the rats received *R. hydrogenotrophicus* (10¹⁰ / ml) while the other half remained only inoculated with the fibrolytic species. Quantification of the two bacterial species, by real time PCR and by cultural method, showed that the population level of *R. intestinalis* reached 10⁹ to 10¹⁰/g in rats mono-associated with this species. The addition of *R. hydrogenotrophicus*, which was found at a level of 10⁷-10⁸ /g content, enhanced the population level of *R. intestinalis*. This enhancing effect was only significant in caecal contents where the population of *R. intestinalis* reached 10¹¹/ g. The total amount of H₂ excreted by animals was 4-fold decreased after inoculation with *R. hydrogenotrophicus* compared to rats mono-associated with *R. intestinalis*, demonstrating in vivo H₂-transfer between the two species. Furthermore, butyrate production in caecal contents was 2-fold increased in rats co-inoculating with the two species compared to the *R. intestinalis* associated animals. Only low acetate concentration could be measured in *R. intestinalis* + *R. hydrogenotrophicus* rats, indicating that acetate transfer should exist in vivo between these two species. H₂ and acetate co-transfers between *R. intestinalis* and *R. hydrogenotrophicus* could thus be demonstrated in vivo, this bacterial interaction leading to homofermentation of dietary carbohydrates into butyrate with low concomitant H₂ production. This *R. intestinalis*-*R. hydrogenotrophicus* associated rats could further represent an interesting in vivo model to investigate the effects of butyrate on the physiology of the host.

IMPACT OF THE ADMINISTRATION OF THE H₂-UTILISING ACETOGEN, RUMINOCOCCUS HYDROGENOTROPHICUS, ON THE STRUCTURE AND METABOLISM OF THE INTESTINAL MICROBIAL COMMUNITY IN HUMAN MICROBIOTA-ASSOCIATED RAT

¹DEL'HOMME C., ¹GAUDICHET C., ¹LEBLOND Y. and ²BERNALIER-DONADILLE A.

¹*Laboratoires Mayoly Spindler, 78401 Chatou cedex, France,*

²*Inra, Unité de Microbiologie UR454, 63122 Saint Genès Champanelle, France.*

bernal@clermont.inra.fr

Gas production associated with the fermentative process in the human gut can be responsible for functional gastrointestinal disorders (FGID). H₂, whose production is higher in patients suffering from these FGID, must be removed from the gut to prevent gas associated symptoms. Among the different pathways of H₂ disposal existing in the human gut, reductive acetogenesis is potentially benefit for human health since it leads to acetate production, a non gaseous and non toxic metabolite. Utilisation of the hydrogenotrophic potential of acetogenic bacteria was thus suggested as new strategy to prevent gas associated troubles through enhancement of H₂ consumption in the gut (patent 0006009). The daily administration of an acetogenic species isolated from the human gut, *R. hydrogenotrophicus*, to human microbiota-associated rat (HMA rat) was shown to induce a large decrease in the amount of H₂ excreted by these animals. The objective of the present work was to study the impact of the administration of *R. hydrogenotrophicus* to HMA rats on the structure and metabolism of the gut microbiota. Two groups of HMA rats were used, one receiving 10¹⁰ *R. hydrogenotrophicus* per day for 15 days and a control group receiving sterile adjuvant for the same period. The major taxonomic and functional groups of microorganisms of the intestinal microbiota were enumerated using cultural methods and short chain fatty acid (SCFA) production was determined in caecal contents of the rats by ¹H-NMR. In animals receiving *R. hydrogenotrophicus*, a significant decrease of the population level of Enterobacteria, as well as an increase of the starch-degrading and hydrogenotrophic acetogenic communities were observed concomitantly to the presence of *R. hydrogenotrophicus*. Acetate concentration and butyrate productions were significantly increased in the caecum of the HFA rats receiving the acetogenic strain. The overall results obtained demonstrated the capability of *R. hydrogenotrophicus* to exercise its hydrogenotrophic acetogenic activity during its transit; the exogenous acetogenic species also affecting the composition and metabolism of the intestinal microbiota. The increase of the starch-degrading community observed in presence of *R. hydrogenotrophicus* could be tentatively explained by H₂ and acetate co-transfers between the predominant amylolytic *Roseburia* species and the acetogenic strain to form butyrate as previously demonstrated in vitro

COMPARAISON DE L'ACTIVITE XYLANOLYTIQUE DE DEUX ESPECES BACTERIENNES MAJEURES DU COLON HUMAIN: BACTEROIDES XYLANISOLVENS ET ROSEBURIA INTESTINALIS

MIRANDE C., KADLECIKOVA E., BERNALIER-DONADILLE A.,
FORANO E. ET BERA-MAILLET C.

INRA, UR454 UNITE DE MICROBIOLOGIE, 63122 SAINT-GENES-CHAMPANELLE.
cmirande@clermont.inra.fr

Chez l'Homme, les parois végétales contenues dans les fibres alimentaires que nous ingérons, sont dégradées par les bactéries fibrolytiques résidant dans le côlon. Le xylane étant l'un des principaux polysaccharides constitutifs des parois végétales, plusieurs souches bactériennes possédant de fortes activités xylanolytiques ont été isolées de selles humaines puis caractérisées. Parmi elles, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A et *Roseburia intestinalis* XB6B4 ont été choisies dans notre étude pour leur représentativité des principaux genres bactériens de la communauté xylanolytique du côlon humain.

Afin d'étudier et comparer les activités xylanolytiques de ces espèces, des cinétiques de croissance de ces bactéries ont été réalisées pendant neuf jours sur différents substrats naturellement riches en xylane (blé, maïs, chou, poireau et pois) et sur xylane purifié. Le suivi de la croissance microbienne est effectué par dosage protéique des fractions bactériennes et extracellulaires. Les produits de fermentation ont été quantifiés par RMN ^1H . L'équipement enzymatique de ces souches, comparé par zymogramme, révèle un grand nombre de xylanases associées aux cellules bactériennes ou extracellulaires, dont les tailles varient de 37 kDa à 250 kDa. Les activités spécifiques des extraits protéiques des deux espèces varient en fonction du temps de croissance des bactéries et de la nature du substrat. Les mesures de l'activité xylanolytique suggèrent que le xylane et les substrats naturels induisent une synthèse maximale d'enzymes entre 24 et 72 heures. Les zymogrammes et les mesures d'activités spécifiques indiquent que les souches étudiées adaptent la synthèse des enzymes à la complexité des substrats. Ces premiers résultats fournissent de nouvelles informations sur la caractérisation des systèmes xylanolytiques de ces espèces récemment isolées.

SUCCINATE PRODUCTION FROM INULIN FERMENTATION BY THE INTESTINAL MICROBIOTA OF CONVENTIONAL RATS RECEIVING INULIN- OR CHICORY-ENRICHED DIET.

¹MARQUET A, ²JACOBS H., ³MOUNDRAS C., ³DEMIGNE C. and BERNALIER-¹DONADILLE A.

¹Inra, Unité de Microbiologie UR 454, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix, 63 122 Saint-Genès-Champanelle, France.

bernal@clermont.inra.fr

²Warcoing Research/COSUCRA, rue de la sucrerie, 2B-7740 Warcoing, Belgique

³Inra, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63 122 Saint-Genès Champanelle, France.

Fructans, especially fructo-oligosaccharides, are recognized to exert interesting effects on human health (calcium and magnesium absorption, butyrate production...), these effects being tightly dependent on modifications within the intestinal microbiota (rise of bifidobacteria). These changes also lead to variations in the SCFA concentration, particularly that of butyrate. Most studies were carried out with purified oligosaccharides. The aim of our study was thus to evaluate the effect of purified and non-purified chicory inulin on digestive fermentations (microbiological and biochemical aspects) in conventional rats. Three groups of rats (n=10) were adapted to 7.5% inulin diets compared to an inulin-free control diets for a 3 months period. Bacterial enumerations were performed in caecal and faecal contents after 1 and 3 months period of diets. The bifidobacteria and lactobacilli populations were enumerated by both cultural and molecular (real time PCR) methods while the inulin-degrading and lactate-utilizing communities were estimating by MPN cultural method. Anionic end-products of bacterial metabolism was measured in caecal contents by ionic chromatography.

Purified- and non-purified inulin could stimulate growth of lactic acid bacteria, only purified inulin enhancing the bifidobacteria population. These substrates also enhanced the lactate-utilising community that is mostly composed of butyrate-producing species in the human gut and that should thus be partly responsible for butyrate production in caecum of rats feed with inulin and chicory diets. Both inulin and chicory also stimulated the inulinolytic community. This bacterial community may also contribute to caecal butyrate production since butyrate-producing inulinolytic species were further isolated. The inulin-degrading community should also be responsible for the succinate production, this metabolite being one of the main end-product of inulin fermentation in the caecum of rat. New *Bacteroides* sp. that mainly metabolizes inulin into butyrate was further isolated.

DIVERSIFICATION DE LA FLORE METHANOGENE COLIQUE ET FORTE PREVALENCE D'UN NOUVEL ORDRE D'ARCHEES METHANOGENES CHEZ LES PERSONNES AGEES

A. MIHAJLOVSKI, J. DORE, M. ALRIC and J.F. BRUGERE

ERT-CIDAM_CBRV 5ème étage

28, Place Henri Dunant

63 000 Clermont-Ferrand

agnes.mihajlovski@u-clermont1.fr

L'intestin humain renferme de l'ordre de 10^{14} microorganismes représentés par 400 à 1000 espèces issues des trois domaines du vivant : Bacteria, Archaea et Eukarya. Ce microbiote est supposé stable tout au long de l'âge adulte. Cependant, au cours du vieillissement, on observe une modification de la composition de ce microbiote, notamment au niveau d'espèces bactériennes telles que les Bifidobactéries et *Bacteroides* sp.

Très peu de données concernent le domaine Archaea : leur biodiversité a longtemps été restreinte à la présence de deux méthanogènes hydrogénotrophes de l'ordre des Méthanobactérialia, *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae*. Cependant une étude récente menée dans notre laboratoire a révélé la présence d'une autre archée probablement méthanogène, affiliable à aucun ordre connu : *Mx-01*.

De manière à étudier une possible relation entre l'âge, la biodiversité et la distribution de la flore méthanogène, une approche moléculaire métabolique utilisant *mcrA* comme marqueur spécifique des méthanogènes, et une analyse phylogénétique menée sur l'ADNr 16S à l'aide d'amorces ciblant les archées, ont été réalisées sur de l'ADN extrait de selles d'un panel de 64 individus d'âge variable.

Ceci a permis de montrer que 86% (18/21) des seniors présentent des méthanogènes dans leur tractus digestif contre seulement 65% (13/20) des adultes et 1/23 des nouveau-nés. Outre la présence de *M. smithii*, retrouvée dans chaque selle *mcrA*⁺ positive, en association ou non avec *M. stadtmanae*, *Mx-01* ainsi que deux nouveaux phylotypes *Mx-02* et *Mx-03*, ont été retrouvés seuls ou en association chez 43% (9/21) des seniors contre seulement 15% (3/21) des adultes. D'après les phylogénies *mcrA*, *Mx-01*, *Mx-02* et *Mx-03*, sont affiliables à un même 6^{ème} ordre d'archées méthanogènes ou elles représentent *a minima* deux genres et trois espèces distinctes, ce que confirme les phylogénies ADNr 16S.

L'impact de ce nouvel ordre sur l'écologie de la microflore colique, la physiologie digestive et la santé, notamment de la personne âgée, restent à déterminer.

LES ADIPOKINES JOUENT-ELLES UN ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DU CANCER DU SEIN EN SITUATION D'OBESITE ?

T JARDE¹, F CALDEFIE-CHEZET¹, N GONCALVES-MENDES¹, L DELORT¹,
C BUECHLER², MP VASSON^{1,3}

¹Univ Clermont 1, UFR Pharmacie, EA4233, ²Département de Médecine Interne I, Université de Regensburg, Allemagne ³Centre Jean-Perrin, Unité de Nutrition, Clermont-Ferrand, France.
thierry.jarde@u-clermont1.fr

L'obésité, qui est un facteur de risque de développement du cancer du sein, s'accompagne d'une diminution du taux circulant d'adiponectine (Adi) et d'une augmentation de celui de leptine (Lep), suggérant une implication de ces sécrétions adipocytaires (adipokines) dans la cancérogenèse mammaire. Ainsi, nous avons évalué l'expression de l'Adi, de la Lep et de leurs récepteurs sur une lignée de cellules issues d'un cancer du sein (MCF-7) et recherché l'influence de ces deux biomolécules sur leurs propres voies de signalisation et sur la prolifération des cellules MCF-7.

L'expression de l'Adi, de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), de la Lep et de ses récepteurs (Ob-Rt, toutes isoformes confondues; Ob-RI, forme longue active) est évaluée par qRT-PCR et immunohistochimie. L'influence de l'Adi (10 µg/ml) et de la Lep (1 µg/ml) sur l'expression des voies de signalisation (qRT-PCR) et sur la prolifération cellulaire (détection de fluorescence) est analysée après 96 h d'incubation.

L'Adi, la Lep et leurs récepteurs spécifiques (ARNm et protéines) sont exprimés par les cellules MCF-7. L'Adi stimule l'expression de son ARNm (+88%, $p < 0,05$) et diminue celle de l'ARNm de la Lep (-36%, $p < 0,1$), d'Ob-Rt (-28%, $p < 0,1$) et d'Ob-RI (-26%, $p < 0,05$). Au contraire, la Lep augmente l'expression de son ARNm (+31%, $p < 0,1$), de celui d'Ob-RI (+30%, $p < 0,05$) et inhibe l'expression de l'ARNm d'AdipoR1 (-23%, $p < 0,05$). L'Adi induit une diminution significative de la prolifération des cellules MCF-7 alors que la Lep la stimule significativement (16 %).

L'Adi et la Lep semblent exercer des activités autocrines et/ou paracrines sur les cellules cancéreuses MCF-7. Par ailleurs, ces deux adipokines présentent des activités antagonistes, que ce soit au niveau de la prolifération des cellules cancéreuses ou sur leur capacité à réguler leurs voies de signalisation. L'implication locale des adipokines au niveau des cellules mammaires cancéreuses ouvre des perspectives d'investigation intéressantes, particulièrement en situation d'obésité.

EVALUATION DU POUVOIR ANTICANCEREUX DE DIFFERENTES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES DE PLANTES DE LA FLORE IVOIRIENNE

Muriel KOFFI^{1,3}, Laetitia DELORT^{1,2}, Nicolas RUIZ^{1,2}, Tsiba GOULLALY^{1,3}, Lorraine GAMEIRO^{1,2}, Yao N'GUESSAN⁵, Pierre CHALARD⁴, Marie-Paule VASSON², Jean-Claude CHALCHAT³, Florence CALDEFIE-CHEZET^{1,2}

1.Laboratoire SVFp; 2.EA 4233 « Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie anti-tumorale », UFR Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont Ferrand ; 3.Laboratoire des Huiles Essentielles, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand ; 4.Ecole de Chimie, Clermont Ferrand ; 5.Université de Cocody, Abidjan

laetitia.delort@u-clermont1.fr

Introduction : Les huiles essentielles (HE) sont connues depuis longtemps pour présenter un certain nombre de propriétés biologiques telles que des propriétés antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires. Récemment, des propriétés antiprolifératives ont été décrites pour certaines d'entre elles¹.

Objectif : L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets de trois huiles essentielles extraites de feuilles d'*Aframomum exscapum* (AET) et d'*Ocimum gratissimum* (OGF) et des graines d'*Aframomum albioviolaceum* (AAG) sur la prolifération de cellules cancéreuses mammaires.

Matériels et Méthodes : Les cellules cancéreuses mammaires en lignée continue MCF7 ont été mises en culture en présence de différentes concentrations de chaque HE : 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,005%. Après 72 heures d'incubation, la prolifération cellulaire a été mesurée par un test de fluorescence à la résazurine (Fluoroskan AscentFL).

Résultats : À la plus forte concentration, une inhibition de la prolifération cellulaire est observée de l'ordre de 80 à 95% pour les trois HE testées. A de plus faibles concentrations, AET semble être plus efficace que AAG ou OGF. Ainsi, les concentrations minimales inhibitrices de la croissance de 50% des cellules sont de 0,2 mg/mL pour AET et de 0,3 mg/mL pour AAG et OGF.

Discussion : Les trois HE testées présentent une activité antiproliférative intéressante. Cette activité est à mettre en relation avec la composition chimique des HE. AET et OGF sont des HE riches en thymol, p-cymène, γ-terpinène alors que AAG est une HE riche en α-humulène et β-caryophyllène. Des analyses complémentaires sont nécessaires afin d'une part de rechercher des effets synergiques ou au contraire antagonistes de ces différentes huiles et, d'autre part, de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Sylvestre M., Phytother res, 2007

ROLE DE BRCA1 DANS LA REPONSE DE CELLULES TUMORALES MAMMAIRES AU TRAITEMENT PAR LA GENISTEINE

PRIVAT M., AUBEL C, ARNOULD S, BERNARD-GALLON D., FERRARA M, BIGNON YJ.

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Centre Jean Perrin
CBRV 28 place Henri Dunant BP38 63001 Clermont Ferrand
04-73-17-83-62

maud.privat@u-clermont1.fr

Les phyto-oestrogènes du soja, notamment la génistéine, semblent posséder un effet protecteur sur le développement du cancer du sein. Le gène *Brca1* est un gène suppresseur de tumeur et des mutations germinales de ce gène sont observées dans une large proportion des cancers familiaux du sein et de l'ovaire. L'objectif de notre étude est de déterminer le rôle de BRCA1 dans des cellules tumorales mammaires traitées par la génistéine.

Pour cela nous avons mis au point un nouveau modèle cellulaire à partir de la lignée de cellules tumorales mammaire SUM1315MO2 portant la mutation 185delAG du gène *BRCA1*. Ces cellules ont été transfectées de manière stable par un plasmide codant pour la protéine BRCA1 sauvage.

Des études de prolifération cellulaire nous ont permis de montrer que la croissance de cellules tumorales mammaires est plus fortement inhibée par un traitement à la génistéine dans les cellules mutées pour *BRCA1*. Afin de préciser le mode d'action de la génistéine sur les cellules mammaires mutées pour *BRCA1*, nous avons ensuite analysé le cycle cellulaire, l'apoptose et la régulation transcriptionnelle de certains gènes de réponse à la génistéine. Nous avons ainsi pu montrer l'implication de BRCA1 dans l'induction de l'apoptose en réponse à la génistéine. De plus, les gènes *CHK2* et *P21* ont été surexprimé par un traitement à la génistéine seulement si la protéine BRCA1 est fonctionnelle, suggérant un rôle de BRCA1 dans la régulation transcriptionnelle de ces 2 gènes.

Notre étude a ainsi permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes dépendants de BRCA1 mis en jeu dans la réponse de cellules tumorales mammaires à un traitement par la génistéine.

DU CANCER HORMONO-DEPENDANT DE LA PROSTATE A LA CREATION D'ONCODIAG

**N. RABIAU, H. SOUILLER, S. DUPLANT, J. DAUPLAT, Y-J. BIGNON,
D. BERNARD-GALLON, Y. DANTAL.**

*Laboratoire d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin - CBRV – 1er étage
28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand*

rabiau@soluscience.fr

Avec 278 000 nouveaux cas de cancers en 2000 contre 160 000 en 1980, la France connaît une augmentation considérable de l'incidence des cancers. Le cancer de la prostate est le premier cancer et la deuxième cause de mortalité par cancer en France chez l'homme (après le cancer du poumon). En 2000, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en France a été estimé à 40309 soit 25% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez l'homme. Le cancer de la prostate est, de nos jours, un véritable problème de santé publique.

Obtenir un diagnostic rapide, fiable et le moins onéreux possible prend donc toute sa dimension. Dans cette optique, l'optimisation et la valorisation d'une chaîne d'analyse transcriptomique permettrait de rendre des conclusions plus fiables et plus rapidement qu'aujourd'hui grâce à l'intégration d'un système d'information à chacune des étapes de la chaîne qui seront la création d'échantillon jusqu'à l'analyse de la biopuce transcriptomique. Le système d'expertise en diagnostic et thérapeutique des cancers d'origine génétique vise à optimiser la plateforme transcriptomique afin de fournir au patient la possibilité de caractériser la signature moléculaire du cancer grâce à une étude du transcriptome. Le système d'information venant en aide aux chaînes d'analyse, la modélisation permet d'augmenter le débit des analyses et par conséquent le rendu des diagnostics gagne en rapidité, fiabilité et traçabilité.

Le projet de création d'entreprise innovante a été baptisé Oncodiag et les premières phases d'étude d'opportunité et de structuration de projet vont démarrer d'ici la fin de l'année 2008.

PHYTO-ŒSTROGENES DU SOJA ET CANCER DU SEIN : INHIBITION DES ONCOSUPPRESSEURS *BRCA1* ET *BRCA2* PAR LA TECHNIQUE D'INTERFERENCE ARN

S. SATIH, Y-J. BIGNON & D. BERNARD-GALLON
Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin, EA 4233, CBRV
28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand
s_satih@yahoo.fr

Le cancer du sein est la tumeur la plus fréquente et la principale cause de mortalité chez la femme. Des facteurs génétiques ont été mis en évidence et des mutations des oncosuppresseurs *BRCA1* et *BRCA2* ont été observées dans la majorité des cas héréditaires de cancer du sein. Dans les cas sporadiques (90 à 95% des cas), ce sont des modulations de leur expression qui ont été démontrées.

Des facteurs environnementaux semblent intervenir également avec une incidence du cancer du sein plus élevée en Occident qu'en Asie et l'étude des populations migrantes met en avant l'alimentation riche en soja des femmes asiatiques. En effet, de nombreuses études soulignent le rôle protecteur d'un apport en génistéine et daidzéine, principaux phyto-œstrogènes de cet aliment.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les modulations transcriptionnelles induites par une inhibition d'expression de *BRCA1* ou *BRCA2* et/ou un traitement par la génistéine et la daidzéine.

Pour cela, une étude *in vitro* a été réalisée sur des cellules humaines mammaires tumorales (MCF-7, MDA-MB-231) et non tumorale (MCF-10a).

Les résultats obtenus par les techniques de microarrays et de RT-PCR quantitative en temps réel (TaqMan[®]) ont montré une action chimiopréventive des phyto-œstrogènes sur le cancer du sein par des modulations significatives de gènes impliqués dans les processus de cancérogenèse mammaire tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, le métabolisme des xénobiotiques ou encore l'angiogenèse.

PREVENTION NUTRITIONNELLE DU CANCER DE LA PROSTATE : EFFETS DES MICRO-CONSTITUANTS DE TOMATES

J. TALVAS, D. GITENAY, A. MAZUR, E. ROCK

INRA Clermont-ferrand-theix, route de Theix, 63122 St Genès Champanelle
italvas@clermont.inra.fr

Les études épidémiologiques ont montré une corrélation entre une consommation accrue de tomates ou produits dérivés et la diminution de risque relatif du cancer de la prostate. Cet effet bénéfique de la tomate a par la suite été conféré au seul lycopène, l'anti-oxydant majeur donnant sa couleur à ce fruit-légume, délaissant alors les autres micro-constituants susceptibles d'avoir des propriétés biologiques.

L'objectif de notre travail a été de mettre en œuvre un concept expérimental nouveau permettant de différencier l'effet de la tomate entière de celui du lycopène. Pour cela, une étude nutritionnelle contrôlée par placebo a été entreprise chez des hommes sains âgés de 50 à 70 ans. Ces 40 hommes ont été répartis en 2 groupes et ont été supplémentés par :

- Des purées de tomates jaunes (dépourvues de lycopène = aliment placebo) ou de tomates rouges en cross over.
- Des compléments alimentaires de lycopène (Gr1) ou de placebo (Gr2) (simple aveugle).

Ces supplémentations ont été entrecoupées de périodes de déplétion de lycopène de 2 semaines. Cette stratégie nutritionnelle a permis d'induire significativement les taux de lycopène plasmatique dans les deux groupes après les supplémentations en tomates rouges et dans le groupe 1 après les supplémentations en lycopène. Les modifications du lycopène plasmatique n'ont pas eu de répercussions positives ou négatives sur les taux de PSA et d'IGF-1 sérique.

Une approche ex vivo a permis de montrer par Taqman Low Density Array que l'incubation de cellules LnCap avec les sérums de nos volontaires permettaient de réguler significativement l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, la croissance cellulaire, l'adhésion cellulaire, le stress oxydant, l'oncogénèse, l'invasion cellulaire.

L'induction du gène IGFBP-3 par les sérums issus des volontaires supplémentés en tomates rouges et lycopène a été confirmée par Q-PCR et semble être particulièrement sensible au statut en lycopène. D'autres gènes par contre (nrf-2) semble être régulés préférentiellement et différemment par les supplémentations en tomates soulignant les différences d'action entre une molécule isolée et une molécule au sein de sa matrice. Enfin, nous observons l'induction de gènes potentiellement délétère comme uPAR impliqué dans l'invasion cellulaire avec les sérums issus des patients supplémentés en lycopène sous forme purifié, un résultat déjà évoqué par un autre groupe travaillant sur des lignées de cancer de prostate agressif.

GINA : UNE PLATE-FORME DE GENOTYPAGE HAUT DEBIT OUVERTE AUX PROJETS AUVERGNATS

Yannick BIDET, Nancy UHRHAMMER, Yves-Jean BIGNON

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Centre Jean Perrin

Yannick.Bidet@u-clermont1.fr

Une part importante de l'activité du laboratoire d'Oncologie Moléculaire consiste dans le diagnostic et la recherche de mutations responsables des prédispositions héréditaires aux cancers du sein et du côlon. Afin de proposer des diagnostics toujours plus fiables et plus rapides, il vient de se doter d'un pyroséquenceur de technologie 454 autour duquel une plate-forme complète a été mise en place. Cette plate-forme comprend les blocs PCR et les automates nécessaires à la production mais également à la purification et à la quantification des ADN à séquencer à haut débit. Le laboratoire a initié plusieurs projets de recherche impliquant cette plate-forme et a largement amorcé la transition technologique du diagnostic. Les très hautes capacités de la plate-forme ne sont cependant pas saturées et le Centre Jean Perrin souhaite désormais ouvrir cet outil à la collectivité scientifique auvergnate. De cette volonté est déjà née une collaboration avec l'UMR 1095 INRA /UBP pour le séquençage de nombreuses régions ciblées du génome du blé.

Le système 454 a été conçu pour le séquençage de novo de génomes entiers. Les logiciels fournis permettent l'assemblage et l'orientation des contigs mais également la comparaison des séquences assemblées à une séquence de référence. Le mélange de produits PCR autorise l'analyse d'un très grand nombre de polymorphismes non contigus.

Si l'on se concentre sur une région plus petite, le nombre élevé de lectures par run permet de déceler des mutations somatiques présentes dans moins de 1% des cellules.

Il existe également des logiciels tiers d'analyse de transcriptome qui permettent par exemple de séquencer de petits ARN non codants, des extrémités 5' de cDNA (5'RATE), ou encore de comparer des expressions par SAGE.

De nombreuses autres applications peuvent être envisagées (épigénomique par exemple) et le personnel de la plate-forme est là pour discuter de la faisabilité de chaque projet.

PRODUCTION DE GLUTAMATE ET DE CO₂ A PARTIR DE GLUTAMINE DANS DES ENTEROCYTES ISOLEES INCUBES DE RATS ADULTES ET DE RATS TRES AGES : ETUDE PAR ¹³C RMN

Dominique MEYNIAL-DENIS¹, Guy BIELICKI², Anne-Marie BEAUFRERE³, Michelle MIGNON¹;
Jean-Pierre RENOU² and Philippe PATUREAU MIRAND¹

INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, 63122 St Genès-Champanelle,
CRNH Auvergne.

dominique.meynial@clermont.inra.fr

La glutamine est le carburant majeur pour les entérocytes et favorise la croissance de la muqueuse intestinale (1, 2). Bien que la supplémentation orale en glutamine exerce un effet positif sur la hauteur des villosités intestinales chez les rats très âgés (3), comment la glutamine a été utilisée par les entérocytes reste à clarifier. C'est pourquoi, des rats femelles adultes (8-mo) et très âgées (27-mo) ont été supplémentées avec de la glutamine durant la moitié de leur vie. Les rats traités ont reçu la glutamine comme additif à leur eau de boisson et les rats contrôle seulement de l'eau. Des cellules épithéliales jéjunales (~ 300x10⁶ cellules) ont été incubées dans un tampon Krebs-Henseleit oxygéné contenant de la [1-¹³C] glutamine (~ 17 M) durant 30 minutes pour analyse des métabolites de la glutamine par ¹³C RMN. Une fraction aliquote a été incubée en présence de [U-¹⁴C] glutamine pour mesurer le CO₂ produit. 98 % des cellules sont restées viables après 30 minutes d'incubation. Les réactions biochimiques sont arrêtées par addition d'acide perchlorique. Le prétraitement à la glutamine a augmenté la production de glutamate (données RMN) alors qu'il a diminué la production de CO₂ chez les animaux très âgés. En effet, le glutamate peut être soit totalement oxydé en CO₂ dans la muqueuse intestinale, soit utilisé dans la synthèse d'un facteur clé de la protection de cette muqueuse (le glutathion) (comme rapporté dans 4). L'importance de chaque voie est dépendante à la fois de l'âge et du prétraitement à la glutamine. Le rapport CO₂/Glutamate, très élevé chez les rats contrôle très âgés, devient semblable quel que soit l'âge après le prétraitement à la glutamine, comme si les très vieux entérocytes avaient récupéré les capacités métaboliques d'entérocytes adultes. En conclusion, la glutamine a un effet bénéfique sur les entérocytes de rats très âgés en favorisant l'utilisation du glutamate comme précurseur du glutathion, ou de la biosynthèse de l'arginine et de la proline, métabolites non détectables dans les spectres ¹³C RMN.

1. Souba et al., *J Parenter Enter Nutr.* 1990, 14:45S-50S.
2. Bouteloup-Demange et al., *Am J Physiol - Gastrointestin Liver Physiol.* 2000, 278:G677-G681.
3. Mignon et al., *J Parenter Enter Nutr.* 2007, 31:456-62.
4. Reeds et al., *J. Nutr.* 2000, 130:978S-982S.

MILK PROTEIN FRACTIONS DIFFERENTLY AFFECT THE LOSS OF FAT FREE MASS DURING FOOD RESTRICTION IN OVERWEIGHT RATS

S. ADÉCHIAN, C. SORNET, C. BOS, C. GAUDICHON, D. DARDEVET and L. MOSONI

INRA, équipe NSP, UMR 1019 Nutrition Humaine,
F-63122 Saint Genès-Champanelle
mosoni@clermont.inra.fr

Treatment of obese patients with restrictive diets induces not only a loss of fat mass (FM) but also of fat-free mass (FFM). A sufficient amount of dietary protein is necessary to limit FFM loss, but the kinetics of amino acid delivery to the organism could additionally play a role. Our aim was to study whether the nature of the dietary protein could influence the loss of FFM: Casein (slowly digested), milk soluble proteins (MSP; rapidly digested) and a mixture casein-MSP (50/50) were compared.

Overweight was induced in male Wistar rats weighing 324.3 (SE 9.9) g by feeding them *ad libitum* a high fat high sucrose diet (HF) for 5 weeks. Nine HF rats were killed and were compared with control rats (n=10) and 3 other HF groups were then fed a restricted amount of a diet (55 % of spontaneous energy intake) containing casein (n=19), MSP (n=18) or the mixture (n=18) as the only source of protein for 3 weeks.

The HF diet induced higher body weight, FM, renal, and epididymal fat pads in HF vs controls ($P<0.05$). Energy restriction induced a significant decrease in weight and FM ($P<0.01$). Casein fed rats maintained higher body weight, FFM, liver and intestine weights compared with MSP or mixture groups ($P<0.01$), but their muscle and liver protein fractional synthesis rates measured *in vivo* in the fed state were not different. We conclude that casein could allow a sparing of FFM during food restriction in overweight rats, but the mechanisms remain to be determined.

UNE SUPPLEMENTATION CHRONIQUE EN LEUCINE CHEZ LE RAT MODIFIE LA SIGNALISATION DE L'INSULINE DANS LE MUSCLE SANS INDUIRE DE RESISTANCE DU TRANSPORT DE GLUCOSE

BALAGE M¹; SORNET C¹; DUPONT, J²; TESSERAUD, S³. et DARDEVET D¹.

¹: INRA, UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, Saint Genès Champanelle, 63122 et UFR Médecine, Clermont-Ferrand, 63001. ²: INRA, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly. ³: INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly.

balage@clermont.inra.fr

La leucine stimule la synthèse protéique musculaire en activant des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la traduction des protéines (mTOR, S6K...). L'activation de ces voies peut inhiber les premières étapes de l'action de l'insuline (phosphorylation IR, IRS1, PI3K...) qui sont des étapes clés dans la régulation du transport et du métabolisme du glucose. L'activation prolongée de ces voies par la leucine pourrait générer des anomalies du métabolisme glucidique et induire une insulino-résistance. Cette étude a pour but d'évaluer l'impact d'une supplémentation chronique en leucine chez le rat sur les voies de signalisation de l'insuline et sur la sensibilité à l'insuline du muscle sur le transport de glucose.

48 rats âgés de 4 mois sont répartis en 2 groupes nourris *ad libitum* d'un régime à 15% de protéines supplémenté (LEU) ou non (T) avec de la leucine (4.5% du régime) pendant 5,5 semaines. A la fin de la période expérimentale et après 18h de jeûne, les rats sont maintenus à jeun (PA) ou reçoivent un bolus nutritif (PP). Les muscles gastrocnémiens sont prélevés 30 min ou 1h plus tard pour les mesures de signalisation. La sensibilité à l'insuline du transport de glucose est mesurée *in vitro* sur épitrochlearis incubés en présence de 2-[³H]DOG et de concentrations croissantes en insuline.

La phosphorylation en tyrosine de IR_β, IRS1 ainsi que l'activité PI3 kinase sont réduites significativement dans le groupe LEU 30 min après l'ingestion du bolus. Par contre, la réponse à l'insuline du transport de glucose dans le muscle est augmentée. Les voies de signalisation de la leucine (S6K1 et phosphorylation de S6rp) ne sont pas affectées.

Une supplémentation chronique en leucine chez le jeune rat adulte induit un retard de la stimulation des étapes précoces de la signalisation de l'insuline en réponse au repas mais ne génère pas de résistance à l'insuline du transport de glucose.

NUTRITION LIPIDIQUE ET STRESS METABOLIQUE LIE A L'AGE : IMPACT SUR LA PHYSIOLOGIE DU TISSU MUSCULAIRE ET INTERACTIONS AVEC LE TISSU ADIPEUX

**V. BARQUISSAU, F. WAUQUIER, P. ROUSSET, A-L TARDY, M-J. DAVICCO, P. LEBECQUE,
Y. WITTRANT, V. COXAM, J-M. CHARDIGNY, B. MORIO**

*Unité de Nutrition Humaine – UMR 1019 - Centre de Recherche en Nutrition Humaine -
Equipe Métabolismes Lipidique et Energétique -58 rue Montalembert, BP321*

63009 Clermont-Ferrand cedex 1

Valentin.Barquissau@clermont.inra.fr

L'augmentation de l'espérance de vie s'accompagne du développement de pathologies métaboliques liées à l'âge, comme le diabète de type 2. Le vieillissement est associé à une augmentation de la masse grasse corporelle et à une inflammation chronique à bas bruit qui altèrent le métabolisme énergétique du muscle squelettique, et pourraient ainsi contribuer à l'apparition d'une insulino-résistance. La compréhension des interactions entre les tissus adipeux et musculaire est donc essentielle pour mettre au point des stratégies de prévention nutritionnelle du diabète de type 2.

Dans cette étude, notre hypothèse est qu'un régime enrichi en Acides Gras Poly-Insaturés (AGPI) à propriétés anti-inflammatoires permettrait de limiter l'inflammation associée au vieillissement, de restaurer les fonctions mitochondriales musculaires et d'améliorer la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique. Des souris de la lignée SAMR1 (contrôle) et SAMP8 (présentant un vieillissement accéléré) ont été soumises à un régime standard, pro-inflammatoire (ratio AGPI n-6/n-3 élevé), anti-inflammatoire (régime pro-inflammatoire + ibuprofène ou régime pro-inflammatoire + oleuropéine) ou enrichi en un AGPI particulier (18:3 ω 6, 18:3 ω 3 ou 20:5 ω 3). L'impact de ces différents régimes sur le dialogue entre les tissus adipeux et musculaire sera étudié :

1/ au niveau fonctionnel par la mesure *ex vivo* de la sensibilité à l'insuline, des capacités oxydatives et de la production d'ATP dans le muscle squelettique,

2/ au niveau mécanistique par l'étude du statut inflammatoire des tissus adipeux et musculaire et au niveau systémique, et des voies de signalisation impliquées dans la réponse métabolique des la cellule musculaire.

NUTRITION LIPIDIQUE ET STRESS METABOLIQUE LIE A L'AGE : IMPACT SUR LA PHYSIOLOGIE DU TISSU OSSEUX ET INTERACTIONS AVEC LE TISSU ADIPEUX

**WAUQUIER Fabien, BARQUISSAU Valentin, WITTRANT Yohann,
DAVICCO Marie-Jeanne, LEBECQUE Patrice, MERCIER Sylvie,
CHARDIGNY Jean-Michel, MORIO Béatrice, COXAM Véronique**

*Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 - Centre de Recherche en Nutrition Humaine
Equipe Alimentation Squelette et Métabolismes - INRA Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle
fwauquier@clermont.inra.fr*

Le vieillissement de l'organisme est associé au développement de désordres métaboliques (maladies cardio-vasculaires, diabète de type 2, ostéoporose) qui peuvent trouver leur origine dans une prise importante de masse grasse et l'apparition d'une inflammation à bas bruit. Le squelette est métaboliquement intimement lié au tissu adipeux par le biais des cellules souches mésenchymateuses (précurseurs communs des cellules ostéoformatrices et des adipocytes) et via la sécrétion d'adipokines susceptibles de moduler la résorption ostéoclastique. Dans un tel contexte, il est important de mieux appréhender les interactions tissulaires et moléculaires impliquées dans les processus de perte osseuse, afin de pouvoir proposer une prise en charge nutritionnelle adaptée.

Notre hypothèse de travail est que les Acides Gras Poly-Insaturés (AGPI) à propriétés anti-inflammatoires peuvent éventuellement limiter l'inflammation associée au vieillissement et contribuer à préserver le capital osseux. Notre objectif est donc d'évaluer l'impact de la qualité des AGPI sur le métabolisme osseux en ciblant :

-dans le cadre d'une approche physiologique, sur un modèle de sénescence accélérée chez la souris (SAMP8), l'impact de différents mélanges d'AGPI sur la physiologie osseuse et adipocytaire (propriétés biomécaniques et minéralisation de l'os, activité sécrétoire du tissu adipeux),

-au niveau cellulaire, les effets des acides eicosapentaénoïque, docosahexaénoïque et α -linoléique et des adipokines sur la différenciation et l'activité des cellules osseuses,

-au niveau moléculaire, l'identification des différentes voies de signalisation impliquées (transcriptomique, protéomique, activité promotrice).

Il est également prévu de valider les résultats obtenus par une étude clinique d'intervention.

IMPACT DES POLYPHENOLS DE L'HUILE D'OLIVE DANS LA PREVENTION DE L'OSTEOPOROSE

**PUEL, C., AGALIAS, A., DAVICCO, M.J., LEBECQUE, P., HORCAJADA, M.N.,
SKALTSOUNIS, AL & COXAM, V.**

*Equipe ASM, UNH - UMR 1019 INRA / Université d'Auvergne
Centre de Clermont-Ferrand / Theix
63122 St-Genès Champanelle
coxam@clermont.inra.fr*

L'incidence moindre de l'ostéoporose dans les pays du pourtour méditerranéen (Kanis, 1993) pourrait s'expliquer par la diversité en micronutriments des produits végétaux et huile d'olive qui caractérisent le régime méditerranéen. En effet, certains micronutriments sont capables de piéger les radicaux libres (Kayano et al., 2004) et de diminuer la production de médiateurs inflammatoires (Chen et al., 2001) impliqués dans la résorption osseuse. En revanche, l'impact des polyphénols de l'olive sur le capital osseux reste à être démontré.

Le but de ce travail était d'évaluer l'impact de l'olive, de ses produits dérivés et de leurs principaux polyphénols sur deux modèles expérimentaux d'ostéoporose : postménopausique (ovariectomie) et sénile (ovariectomie associée à une inflammation chronique par administration de talc).

La supplémentation en polyphénols a permis de prévenir l'ostéopénie induite par l'ovariectomie associée à un état inflammatoire chez la rate. L'oleuropéine (0,00375% à 0,0225%), du fait de ses propriétés anti-inflammatoires, évite les processus de déminéralisation. L'effet bénéfique de son métabolite, l'hydroxytyrosol et du tyrosol (0,017%), semble plutôt résulter de leurs capacités anti-oxydantes.

Il apparaît que le vecteur alimentaire de ces polyphénols module leur action protectrice vis à vis du squelette. Les margines (0,17%) et les olives vertes (50%), du fait qu'elles ne préviennent pas l'augmentation des paramètres inflammatoires, sont incapables de restaurer la masse osseuse. Alors que les olives noires (30%) et l'huile d'olive (5%) préviennent l'ostéopénie induite en améliorant le statut inflammatoire et oxydant.

En conclusion, chez la rate, les polyphénols de l'olive semblent avoir un effet protecteur sur la masse osseuse qui est modulé par la matrice dans lesquels ils sont véhiculés.

LA PRESENCE D'UNE INFLAMMATION A BAS BRUIT CHEZ LE RAT AGE N'AGGRAVE PAS LA PERTE DE MASSE MUSCULAIRE INDUITE PAR UNE INFECTION

Gilles MAYOT ¹, Karine VIDAL ², Denis BREUILLE ², Stephanie BLUM ²,
Christiane OBLED ¹, Isabelle PAPET ¹

¹ INRA, Centre Clermont-Ferrand – Theix, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine,
63122 Saint-Genès-Champanelle, France

² Nutrition and Health Department, Nestlé Research Center, 1000 Lausanne 26, Switzerland
papet@clermont.inra.fr

Les personnes âgées sont vulnérables face aux infections et ceci pourrait être aggravé chez celles qui présentent déjà une inflammation. Le but de cette étude est de tester l'impact d'une infection chez le rat âgé présentant ou non une inflammation à bas bruit, sur la perte de poids corporel, la masse et le métabolisme protéique musculaires.

Des rats mâles, Wistar, âgés de 24 mois, apparemment sains (620 g) ont été répartis en deux catégories : non enflammés (NI) ou enflammés à bas bruit (IBB) selon leurs concentrations plasmatiques en α_2 -macroglobuline et fibrinogène. L'infection a été induite par l'injection intraveineuse de $3,5 \times 10^8$ Escherichia coli (sérotypage O153:K-:H- strain) par rat puis ils ont été placés dans des cages individuelles et nourris avec un régime en poudre contenant 18% de caséine. Le poids corporel, le poids et la vitesse de synthèse protéique du muscle squelettique ont été mesurés avant l'infection à J0 (groupes NI-J0 et IBB-J0), 10 (groupes NI-J10 et IBB-J10) et 23 (groupes NI-J23 et IBB-J23) jours après l'infection (n= 8-11). Les résultats ont été comparés par ANOVA à deux facteurs (statut inflammatoire initial et temps). L'impact du statut inflammatoire initial sur la mortalité postinfectieuse a été analysé par régression univariée de Cox avec les concentrations en α_2 -macroglobuline et fibrinogène comme variables continues.

La mortalité postinfectieuse a été indépendante des concentrations en α_2 -macroglobuline et fibrinogène et atteignait 11 % à J10 et 18 % à J23. Le poids corporel était plus faible chez les rats infectés par rapport aux non infectés, sauf pour le groupe IBB-J10. A J23, Les poids des muscles gastrocnemius, tibialis anterior, EDL and soleus étaient plus faibles qu'avant l'infection de 22, 22, 15 et 12% respectivement, quel que soit le statut inflammatoire initial des rats. La synthèse totale des protéines du gastrocnemius était indépendante du statut inflammatoire initial des rats. Elle diminuait de 25 % à J10 et était normalisée à J23.

Ces résultats confirment nos observations précédentes indiquant que l'inflammation à bas bruit n'aggrave pas la sarcopénie, même après un stress infectieux.

UN REGIME HYPERLIPIDIQUE/HYPERCALORIQUE ENTRAINE UNE DIMINUTION DE LA VITESSE DE SYNTHESE PROTEIQUE MUSCULAIRE, UNE DEFAILLANCE DU TISSU ADIPEUX ?

N. TARDIF, J. SALLES, C. GUILLET, P. ROUSSET, C. GIRAUDET, V. PATRAC,
C.MIGNE, J-M. CHARDIGNY, Y. BOIRIE, S. WALRAND
UNH, UMR1019, INRA/UdA, Equipe A.M.M.,
58 rue mMontalembert 63009 Clermont-Ferrand Cedex 1
nicolas.tardif@clermont.inra.fr

Introduction : Le vieillissement se caractérise par une perte de masse musculaire et un gain de masse grasse associé à une augmentation de la résistance à l'insuline. La diminution de la sensibilité à l'insuline (I_0S) due à l'obésité pourrait s'expliquer par deux phénomènes, la lipotoxicité et/ou l'inflammation à bas bruit. L'objectif de ce travail était d'observer les conséquences de l'obésité au cours du vieillissement sur le renouvellement protéique musculaire.

Matériels et méthodes : Durant 10 semaines, 34 rats WISTAR âgés de 6 ou 25 mois ont été repartis en 4 groupes et ont reçu un régime normo- (JNL, VNL) ou hyper-lipidique/hyper-calorique (JHL, VHL). Un test de tolérance au glucose (IPGTT) a été réalisé afin d'évaluer l' I_0S . Le statut inflammatoire a été évalué en mesurant le taux plasmatique du récepteur soluble du TNF- α (sTNF-R2). Les taux de céramides (CER), de diglycérides (DG) et de triglycérides (TG) ont été dosés au sein des muscles *tibialis anterior* (*Ta*) et *soleus* (*Sol*). Le FSR a été calculé à partir de l'enrichissement en [^{13}C]valine des protéines musculaires (*Ta*)

Résultats : Le groupe VHL est le plus insulino-résistant ($p \leq 0,05$ vs. JNL, JHL et VNL). La concentration plasmatique en sTNF-R2 du groupe VHL est supérieure à celle de JNL, JHL, et VNL ($p \leq 0,05$). La vitesse de synthèse des protéines totales est diminuée de 18,6% pour les VHL ($p \leq 0,05$ vs VNL), il n'y a aucune modification chez les jeunes suite au régime HL. Dans le *Sol* la concentration des dérivés lipidiques est plus augmentée avec l'âge (effet âge, $p \leq 0,05$) avec un taux de céramides plus important chez les VHL comparativement aux VNL. Au sein du *Ta* seul le taux de TG est augmenté significativement.

Conclusion : Nous observons une accumulation liée à l'âge des dérivés lipidiques au sein des muscles des rats. Ce phénomène est aggravé par notre régime HL uniquement chez les rats âgés. L'augmentation de l'inflammation chez les VHL pourrait être responsable de la dérégulation de la fonction tampon du tissu adipeux entraînant un stockage ectopique des graisses. Les conséquences ont été une augmentation de l'insulino-résistance et une diminution de la synthèse protéique musculaire.

EFFET DE LA CONSOMMATION D'AMIDON RESISTANT SUR LA SENSIBILITE A L'INSULINE CHEZ LE RAT SOUMIS A UN REGIME HYPERLIPIDIQUE

DIAZ-RUBIO M E (1), BESSON C(1), DARDEVET D(1), MAZUR A(1), SCALBERT A(1), COMTE B(1)

(1)Unité de Nutrition Humaine, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France
Unité de Nutrition Humaine, INRA
Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix
63122 St Genes-Champanelle.France
mrubio@clermont.inra.fr

Certaines fibres alimentaires et plus particulièrement l'amidon résistant peuvent avoir un impact sur le métabolisme glucidique et la résistance à l'insuline. L'objectif de ce travail est de mieux en comprendre les mécanismes d'action.

Trois groupes de 6 rats Wistar âgés de 7 semaines et pesant environ 200 g ont été soumis aux 3 régimes suivants : contrôle (C; 5 g de lipides/100 g de régime), hyperlipidique (HF; 30,4 g de lipides/100 g de régime) et hyperlipidique enrichi en amidon résistant (HF-RS; 30,4 g de lipides/100 g, 41,6 g/100 g amidon Hi-Maize260[®] substitué à l'amidon) pendant 9 semaines. Des tests de tolérance orale au glucose (OGTT) ont été réalisés à 0, 4 et 8 semaines. Les animaux ont été sacrifiés après 9 semaines de régime. Les muscles épitrochléaris ont été prélevés et incubés *in vitro* pour mesurer la sensibilité du transport de glucose à l'insuline.

Les rats du groupe HF ont significativement pris plus de poids ($p < 0,01$, one way-Anova) que les rats C malgré une consommation de nourriture similaire. La prise de poids est normalisée au niveau du groupe C par ajout d'amidon résistant (groupe HF-RS). Les rats du groupe HF présentent une altération du métabolisme du glucose en montrant une excursion glycémique plus élevée après une charge orale en glucose comparée à celle des rats contrôles C ($p < 0,05$, one way Anova). L'ajout d'amidon résistant au régime (groupe HF-RS) permet de normaliser l'OGTT mesuré après la charge en glucose ($p < 0,001$ vs régime HF, one way Anova). Les résultats préliminaires de mesure de sensibilité du transport de glucose musculaire à l'insuline montrent que les animaux HF présentent une résistance à l'insuline du transport de glucose musculaire (résistance périphérique), normalisée par l'addition d'amidon résistant. Nos résultats montrent que la présence d'amidon résistant pourrait prévenir le développement de l'insulinorésistance associée à la consommation de régimes riches en matières grasses.

EFFET D'UN REPAS ENRICHIS EN ACIDES GRAS TRANS D'ORIGINE ANIMALE OU INDUSTRIELLE SUR LE METABOLISME POSTPRANDIAL DES LIPOPROTEINES- ETUDE PRELIMINAIRE

J MOURIOT, F COMPAGNON, JM CHARDIGNY et C MALPUECH-BRUGERE

Unité de Nutrition Humaine

UMR INRA Université d'Auvergne 1019

58, rue Montalembert

63009 CLERMONT-FERRAND Cedex 1

Corinne.MALPUECH-BRUGERE@u-clermont1.fr

Background: La consommation de matières grasses partiellement hydrogénées, riches en acides gras trans (IP-TFA) est délétère sur le développement des pathologies cardiovasculaires. Par contre, l'effet de la consommation d'acides gras trans (R-TFA) issus de matières grasses provenant des ruminants sur les facteurs de risque cardiovasculaires a été peu étudiée. En outre, la réponse lipémique postprandiale jouerait un rôle important dans la pathogénicité de l'athérosclérose. L'intensité du pic et la cinétique du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (TG) dans les heures suivant un repas riche en lipides seraient prépondérants dans la pathogénèse de l'athérosclérose qui est par ailleurs une maladie inflammatoire chronique.

Objectif: Il s'agit de déterminer chez le volontaire sain de sexe masculin d'âge moyen, s'il existe une différence d'impact entre un repas riche en IP-TFA et un repas enrichi en R-TFA sur le métabolisme postprandial et la composition des lipoprotéines riches en TG.

Protocole: Il s'agit d'une étude interventionnelle contrôlée, randomisée, en simple aveugle. 20 jeunes hommes normolipémiques ont été recrutés. Ils ont ingérés à 2 reprises et à 4 semaines d'intervalle un repas riche en IP-TFA et en R-TFA. L'évaluation de l'oxydation des lipides a été faite par calorimétrie indirecte. Les prélèvements sanguins ont permis de suivre en cinétique l'évolution de la composition en acides gras des lipoprotéines riches en TG, les concentrations plasmatiques de cholestérol total, HDL et LDL-cholestérol.

Résultats: Il existe un effet « origine des AGT » sur la composition des lipoprotéines riches en TG. L'élévation du cholestérol total est majorée avec les IP-TFA et le rapport HDL/cholestérol total est, quant à lui, diminué.

Conclusion: Ces premiers résultats mettent en évidence que les AGT d'origine industrielle (IP-TFA) et les AGT d'origine animale (R-TFA) ont des effets différents sur le métabolisme postprandial des lipoprotéines et sur les marqueurs du risque cardiovasculaire.

Food metabolome : Recherche de biomarqueurs d'exposition aux phytomicronutriments et à leurs aliments source

Manach C., Hubert J., LLorach R., Martin J.F., Pujos E., Morand C. Scalbert A.
*INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR1019, Unité Nutrition Humaine,
Equipes MIMES et Plateforme d'Exploration du Métabolisme
63122 Saint-Genès-Champanelle.
manach@clermont.inra.fr*

La métabolomique constitue une avancée très substantielle pour évaluer l'exposition à des micronutriments, aliments, ou régimes alimentaires, à partir de l'analyse de milliers de métabolites présents dans les fluides biologiques. Nous avons engagé des travaux de caractérisation du « Food metabolome » dans plusieurs études chez l'animal et chez l'homme. Il s'agit d'identifier au sein du métabolome urinaire analysé par spectrométrie de masse haute-résolution (LC-QToF) les métabolites directement issus de la digestion des aliments d'origine végétale et de l'absorption des phytomicronutriments qu'ils contiennent. Nous avons montré la faisabilité de l'approche dans le cadre de deux études d'intervention contrôlée. Dans une première étude en cross-over randomisé (NIH-DIGEST Study, collaboration avec J. Lampe, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle), le métabolome urinaire nous a permis de discriminer facilement les individus ayant consommé pendant 2 semaines un régime riche ou pauvre en aliments sources de phytomicronutriments (Citrus, soja, crucifères). Les métabolites de polyphénols, et en particulier les métabolites d'isoflavones ont été retrouvés parmi les marqueurs les plus discriminants de ces régimes. Une seconde étude d'intervention a été réalisée au LNH du CRNH d'Auvergne dans le cadre de l'ANR Agruvasc. Chez 5 volontaires ayant consommé alternativement 3 boissons test (jus d'orange, jus de pamplemousse et boisson témoin), les variations du métabolome urinaire ont révélé de nouveaux marqueurs potentiels d'exposition aux agrumes, notamment le bergaptol glucuronide pour la consommation de pamplemousse. Ces marqueurs seront appliqués par la suite à la caractérisation des typologies alimentaires dans des études de cohortes (projets en construction avec UREN Bobigny, INSERM Villejuif).

Stress métabolique induit par un repas hyperlipidique chez l'homme : identification des modifications des métabolites et des protéines plasmatiques

N. Dejeans, J.A. Maier, A. Herosimczyk, T. Sayd, C. Chambon, I. Tauveron, A. Mazur

*Unité de Nutrition Humaine, UMR1019
INRA Theix, 63122 St Genès Champanelle
mazur@clermont.inra.fr*

L'hypertriglycéridémie postprandiale conduit à un dysfonctionnement vasculaire associé au stress oxydant et à la réponse inflammatoire. L'objectif de ce travail a été d'étudier un stress postprandial hyperlipidique au niveau plasmatique et vasculaire. Le plasma et le sérum de volontaires sains ont été prélevés à différents temps avant et après ingestion de lipides. Les paramètres biochimiques plasmatiques ont montré l'augmentation de la concentration des triglycérides et des acides gras libres 4 h après ingestion de lipides. La diminution progressive du NO témoigne de l'induction du dysfonctionnement vasculaire. L'étude protéomique au niveau plasmatique a permis de mettre en évidence les variations de 15 fragments protéiques. Entre autres, nous observons une réduction de l'abondance de 5 fractions de protéines du complément C3 et C4. La mise en présence des HUVEC avec le sérum des volontaires, prélevé 4h après ingestion de lipides, a entraîné une baisse de leur prolifération mais pas de changement dans leur capacité d'adhésion aux monocytes, en comparaison au sérum préprandial. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des modifications induites par un repas riche en graisses chez des volontaires sains. Ces modifications permettent de comprendre plus précisément les mécanismes à l'origine du stress métabolique postprandial, en particulier des phénomènes inflammatoires.

Effet des polyphénols sur le développement de l'athérosclérose chez la souris apoE déficiente: étude histologique et transcriptomique.

D. Milenkovic, S. Auclair, C. Besson, A. Mazur, A. Scalbert.

Unité de Nutrition Humaine, INRA, Clermont-Fd / Theix, 63122 St Genès Champanelle
dmilenko@clermont.inra.fr

Des données épidémiologiques montrent que la consommation alimentaire de flavonoïdes contenus dans différents aliments et boissons et en particulier les pommes, le thé, le vin rouge, ou les oignons est associée à une réduction du risque cardiovasculaire. Il est établi que différents facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires sont associés à un dysfonctionnement endothélial, qui lui-même contribue à la pathogénie de l'athérosclérose. Les antioxydants participent au maintien du bon fonctionnement de l'endothélium vasculaire par divers mécanismes et notamment la protection du NO. Les polyphénols, antioxydants majeurs de l'alimentation, suscitent beaucoup d'intérêt pour leur rôle dans la protection cardio-vasculaire. Nous avons donc étudié les effets de l'ingestion de polyphénols sur le développement des lésions athéromateuses et les mécanismes moléculaires associés.

Nous avons utilisé pour modèle des souris apoE déficientes qui développent spontanément l'athérosclérose. Ces souris ont reçu un régime contrôle ou un régime supplémenté en catéchine (polyphénol présent dans divers fruits, le vin, le chocolat) pendant 6 semaines. Le développement des lésions athéromateuses a été suivi par une analyse histologique de la crosse aortique. Une réduction de 25% du développement des lésions athéromateuses est observée. L'analyse de l'expression des gènes réalisée sur les aortes des souris ayant reçu un régime supplémenté en catéchine montre que l'expression d'environ 500 gènes a été modifiée par ce traitement. Certains de ces gènes, impliqués dans des mécanismes clé liés au développement des lésions athéromateuses, telles que les molécules d'adhésions, absorption lipidique mais aussi des voies métaboliques tels que la synthèse des acides gras ou le métabolisme énergétique, ouvrent de nouvelles pistes pour identifier les mécanismes à l'origine des effets protecteurs des polyphénols.

Altération de la production du monoxyde de carbone dans des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) déficientes en folates.

Sameh Herga, Aurélie Goux, Jean-Marc Alberto*, Didier Viala, Philippe Gérard*, Jean-Louis Guéant*, Patrick Brachet

Equipe MiMeS, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, CRNH d'Auvergne, INRA Centre de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle

**Unité Inserm 724, Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, Faculté de Médecine, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy
brachet@clermont.inra.fr*

Introduction La déficience en folates (FOL) en grande partie générée par des apports nutritionnels insuffisants a une prévalence de ~ 25% dans la population âgée. De nombreuses études cliniques l'ont associée à un risque augmenté de pathologies dégénératives telles que les maladies vasculaires occlusives (MVO) via l'activation du processus d'athérosclérose. Les FOL sont essentiels à la synthèse des acides nucléiques, aux réactions de transméthylation (rTM) dépendantes de la S-adénosylméthionine (SAM) et à la reméthylation de l'homocystéine (HCY) en méthionine. L'altération d'un ou plusieurs de ces mécanismes contribuerait à l'augmentation du risque de MVO associée à la déficience en FOL. Toutefois, d'autres mécanismes plus spécifiques semblent également être impliqués dans la dysfonction endothéliale résultant de cette condition.

Méthodes Avec l'objectif de mieux appréhender ces mécanismes, nous avons exposé des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) à des milieux de culture, élaborés au laboratoire, suffisants (SUF) ou déplétés (DEP) en acide folique (AF), la forme synthétique des FOL généralement utilisée comme supplément.

Résultats La déficience en AF augmente l'export d'HCY par les HUVEC vers le milieu extracellulaire au cours du temps. Elle perturbe également les taux intracellulaires de FOL, SAM et de S-adénosylhomocystéine (SAH), le produit des rTM, en provoquant paradoxalement une accumulation transitoire de SAM au bout de 6 h. La déplétion en AF provoque de plus une réduction de la production d'oxyde nitrique (NO) significativement mesurable après 15 h relativement à la condition SUF. L'augmentation concomitante de l'abondance de la NO synthase endothéliale (eNOS) rapportée à celle de l'actine (x 1,25 fois après 24 et 48 h, P = 0,004) suggère que, dans les HUVEC déficientes en FOL, l'activité eNOS est « découplée » vers la production d'anions superoxyde à la place du NO. Ce résultat explique en partie les effets bénéfiques d'apports suffisants en FOL sur la fonction endothéliale de sujets à risque de MVO.

Modifications du protéome aortique avec l'apport alimentaire en folates chez le rat

Aurélie Goux, Aurélie Chanson, Nicolas Gérard, Sameh Herga, Patrick Brachet
Equipe MiMeS, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne,
INRA Centre de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle,
brachet@clermont.inra.fr

Introduction Un statut déficient en folates (FOL) est corrélé à un risque accru de maladies cardiovasculaires (MCV) au cours du vieillissement. Une supplémentation en acide folique (AF) a des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire, attribués en partie à la diminution concomitante du taux sanguin d'homocystéine (HCY). Toutefois, ceci n'apparaît pas suffisant pour réduire significativement le risque cardiovasculaire chez des patients. L'étude du protéome aortique devrait apporter de nouvelles informations pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'association inverse entre apport nutritionnel en folates et risque vasculaire.

Méthodes Des rats mâles adultes ($n = 8/\text{groupe}$) ont été nourris avec un régime déplété (FD), contrôle (C) ou supplémenté en AF (FS) pendant 8 semaines. Une analyse protéomique basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée sur l'aorte de ces animaux débarrassée de l'adventice. Les gels obtenus ont été analysés avec le logiciel SameSpots.

Résultats Comparativement aux rats C, les rats FD présentaient des niveaux plasmatiques de FOL et HCY respectivement diminués et augmentés, alors que les rats FS avaient des taux circulants de FOL accrus sans variation de leur homocystéinémie. Parmi les ~ 500 spots protéiques détectés par gel, 29 présentaient des volumes variant significativement entre les 3 conditions d'apport en AF (ANOVA: $P < 0,05$), la variation maximale observée entre 2 groupes étant de 1,9 fois. Les volumes de 1 et 5 spots étaient respectivement corrélés positivement et négativement avec la dose d'AF. Spécifiquement, les volumes de 5 et 4 spots augmentaient, et ceux de 2 et 1 spots diminuaient, respectivement chez les rats FD et FS par rapport aux C. Par contre, une augmentation et une diminution de volume étaient respectivement observables pour 8 et 3 spots à la fois chez les FD et les FS relativement aux C. Enfin, des analyses MALDI-TOF et LC-MS/MS ont permis d'identifier de manière univoque 18 protéines aortiques différentes, d'abondance significativement modifiée par la déficience et/ou la supplémentation en AF.

Mortalité cardio-vasculaire et exposition à l'arsenic hydrique en Auvergne

Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Sauvart-Rochat MP.

Laboratoire Santé Publique et Environnement - Faculté Pharmacie – Université d'Auvergne – 28 place Henri Dunant - 63000 Clermont-Ferrand
nathalie.marchiset@u-clermont1.fr

Les effets cardiovasculaires (hypertension, maladies ischémiques cardiaques, accidents vasculaires cérébraux) de l'arsenic (As) présent dans l'eau de boisson ont été étudiés dans des pays où les niveaux d'As dans l'eau sont élevés (>100 µg/L). En France, une étude sur le niveau d'As présent dans l'eau a montré que plus de 200 000 personnes (la moitié vivant en Auvergne) étaient desservies par une eau renfermant plus de 10 µg/L d'As (valeur seuil établie par l'OMS). Dans ce contexte, une étude écologique a été initiée en Auvergne afin d'évaluer la mortalité par pathologies cardiovasculaires (codes CIM-9 : 390-459) entre 1979 et 1999 au regard de l'exposition à l'As hydrique.

Les données démographiques et de mortalité ont été fournies par l'INSEE et le service national de statistiques médicales de l'INSERM (Cepi-DC). Les ratios standardisés de mortalité (RSM) ont été calculés par la méthode de standardisation indirecte (par sexe, par tranche de 5 ans, en tenant compte des données du recensement de 1982, 1990 et 1999, pour chaque commune d'Auvergne). L'exposition à l'As hydrique a été estimée à partir des données du contrôle sanitaire (base SISE-Eaux). Elle a été estimée par le calcul des niveaux moyens d'As présents dans l'eau au niveau des unités de distribution individuelles (UDI). Les analyses géographiques ont été réalisées avec système d'information géographique (SIG) MapInfo.

Depuis 1979, une surmortalité cardiovasculaire est observée en Auvergne, aussi bien chez les hommes que chez les femmes. La surmortalité apparaît plus fréquente dans la population féminine que masculine. Une tendance de surmortalité a été observée parmi les femmes vivant dans les zones géographiques où la concentration en As hydrique dépasse la limite de qualité sanitaire.

Exposition à l'arsenic hydrique dans une cohorte de sujets coronariens

Marie C, Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Fontana L, Lusson JR, Sauvart-Rochat MP.

Laboratoire Santé Publique et Environnement - Faculté Pharmacie – Université d'Auvergne – 28 place Henri Dunant - 63000 Clermont-Ferrand
nathalie.marchiset@u-clermont1.fr

Depuis peu, le rôle de l'arsenic hydrique est reconnu dans les maladies cardiovasculaires, lors d'exposition prolongée à des concentrations supérieures à 100 µg As/L. Néanmoins, à faibles concentrations (< 100 µg As/L), des preuves restent encore à apporter. L'étude Cardiotox est une enquête de cohorte réalisée dans le Puy de Dôme, département caractérisé par un taux élevé de mortalité par maladie coronarienne et par des niveaux d'arsenic hydrique supérieurs à la valeur guide de l'OMS (< 10 µg As/L). Cette étude a permis le suivi sur 7 ans (2001-2008) de 245 sujets coronariens. La pathologie coronarienne a été définie selon des critères coronarographiques validés. Les données portant sur les facteurs de risque cardiovasculaires, les habitudes alimentaires, la consommation d'eau, le mode de vie, la pathologie coronarienne ont été recueillies en 2001 et en 2008, lors d'entretien avec des questionnaires standardisés. Les sujets ont été répartis en groupe exposés (As-aN) et non exposés (As-N) sur une base géographique, en fonction de la teneur en As de l'eau d'adduction. Les quantités d'arsenic apporté par l'eau consommée (froide, chaude et totale) au domicile et sur le lieu professionnel ont été calculées, afin d'estimer l'exposition cumulée à l'arsenic hydrique de chaque sujet.

Sur la période d'étude, le groupe As-aN consomme plus d'eau du robinet (eau froide et eau chaude) et moins d'eau embouteillée que le groupe As-N, au domicile et sur le lieu professionnel, malgré les messages d'alerte diffusés par les autorités sanitaires du Puy de Dôme. Pour le groupe As-aN, l'exposition cumulée observée à l'arsenic hydrique peut largement dépasser l'exposition cumulée théorique à l'arsenic apporté par les aliments et l'eau de boisson observée dans la population française. Entre 2001 et 2008, l'évolution de la maladie coronarienne est marquée chez tous les sujets de Cardiotox, mais elle ne peut pas être expliquée uniquement par l'exposition à l'arsenic hydrique ; de plus, la mortalité entre les groupes As-aN et As-N ne diffère pas significativement.