



La diminution de la concentration tissulaire en glutathion induite par un traitement au paracétamol n'est pas limitée au foie chez le rat

Carole C. Mast, Charlotte Joly, Françoise Glomot, Philippe Lhoste,
Dominique Dardevet, Isabelle I. Papet

► To cite this version:

Carole C. Mast, Charlotte Joly, Françoise Glomot, Philippe Lhoste, Dominique Dardevet, et al.. La diminution de la concentration tissulaire en glutathion induite par un traitement au paracétamol n'est pas limitée au foie chez le rat. 5. Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH). FRA., 2012, Clermont-Ferrand, France. hal-02745682

HAL Id: hal-02745682

<https://hal.inrae.fr/hal-02745682>

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



5^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne

Pôle Physique des Cézeaux, 22 novembre 2012

Organisation : Bureau CRNH Auvergne



Programme

8h00 Accueil, installation des posters

9h00 Introduction (N Cano)

9h15-10 h00 Tissus osseux et musculaire (L. Combaret)

- CO1 La diminution de la concentration tissulaire en glutathion induite par un traitement au paracétamol n'est pas limitée au foie chez le rat.
Mast C, Joly C, Glomot F, Lhoste P, Dardevet D, Papet I
- CO2 Prévention nutritionnelle de l'ostéoporose par un polyphénol, la fisétine: mécanismes d'action.
Léotoing L, Wauquier F, Davicco M-J, Lebecque P, Mercier S, Guicheux J, Miot-Noirault E, Wittrant Y, and Coxam V
- CO3 Etude protéomique du vieillissement musculaire chez la femme post-ménopausée.
Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Chambon C, Bijlsma A, Maier A, Polge C, Taillandier D, Combaret L, Attaix D, Butler-Browne G, Picard B, Béchet D

10:00- 10:30 pause

10h30 –11h15 Pathologie dégénérative cardiovasculaire (S. Polakof)

- CO4 La teneur hépatique en F4-Neuroprostanes : une variable prédictive majeure de la réduction de la plaque d'athérome.
Gladine C, Joumard-Cubizolles L, Zmojdian M, W Newman J, Durand T, Galano J-M, Demougeot C, Berdeaux O, Pujos-Guillot E, Mazur A, Comte B
- CO5 Utilisation d'une approche métabolomique pour la recherche de nouveaux biomarqueurs de consommation d'aliments d'origine végétale.
Fillâtre Y, Rothwell J.A, Touvier M, Lyan B, Martin J.-F, Gueho S, Fezeu L, Arnault N, Sébédio J.-L, Comte B, Hercberg S, Pujos-Guillot E, Galan P, Manach C
- CO6 Approche intégrative de la flexibilité métabolique au niveau du foie chez le rat insulino-résistant.
Polakof S, Dardevet D, Besson C, Larquier M, Joly C, Martin J-F, Mazur A, Sébédio J-L and Comte B

11h15 -12h05 Conférence – Dominique Langin (Toulouse)

"Mobilisation lipidique adipocytaire et insulino-résistance"

12:15 – 13 :30 Repas

13h30 – 14h15 Cancer hormono-dépendants (F. Caldefie)

- CO7 Cancer de la prostate et modifications de méthylation de l'ADN induites par les phyto-œstrogènes du soja: Analyse globale du méthylome.
Adjakly M., Ngollo M, Boiteux J-P, Bignon Y-J, Guy L, Bernard-Gallon D
- CO8 La leptine module in vitro le statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires.
Mahboul S., Ortega S, Rougé S, Vasson M-P, Rossary A
- CO9 Criblage de gènes dérégulés par le cholestérol dans la prostate pré-cancéreuse. Implication des récepteurs LXRs.
de Boussac H., JC Pommier A, Dufour J, A Lobaccaro J-M, Baron S

14h15 – 15h45 Posters

15:45 - 16:00 Pause

16h00 – 16h45 Tractus gastro-intestinal (N. Barnich)

- CO10 *Saccharomyces cerevisiae* prevents adherent-invasive E. Coli-induced increased intestinal permeability and inflammation in the transgenic mouse model expressing CEACAM6.
Sivignon, A. de Vallee, N. Barnich, J. Denizot, P. Vandekerckove, A. Darfeuille-Michaud
- CO11 Régulation de l'inflammation gastrique par l'hème oxygénase-1 lors de l'infection par *Helicobacter pylori*.
P. Gobert A, Verrière T, de Sablet T, M. Peek R, Chaturvedi R, T. Wilson K
- CO12 De la mécano-perception du peuplier à la sensibilité viscérale chez la souris : Rôle ubiquitaire du facteur EGR-4 ?
Accarie A, Naya-Aquilué L, Chrétien E, Fournier-Blanc N, Chao Miao J, Junien J-L, Gelot A, Ardid D

POSTERS

Tissus osseux et musculaire (L-E Monfoulet – C. Polge)

- P1 La 1,25 (OH)₂-vitamine D₃ potentialise les effets de la leucine et de l'insuline sur la synthèse protéique au sein des myotubes C2C12.
Salles J, Chanet A, Giraudet C, Patrac V, Jourdan M, Luiking Y, Verlaan S, Boirie Y, Walrand S
- P2 The E2 enzyme UBE2B is implicated in myofibrillar protein degradation in C2C12 myotubes.
Leulmi R, Claustre A, Jarzaguet M, Attaix D, Polge C, Taillandier D
- P3 La présence d'une inflammation bas bruit non pathologique chez la personne âgée altère la fonctionnalité musculaire sans affecter la réponse anabolique au repas.
Buffière C, Savary-Auzeloux I, Duclos M, Migné C, Hercberg S, Cano N, Rémond D and Dardevet D
- P4 Effets du rythme et de la nature des protéines ingérées sur le maintien de la masse maigre pendant une restriction énergétique chez des sujets obèses ou en surpoids.
Adechian S, Remond D, Migné C, Quinard-Boulangé A, Maset-Baglieri A, Rousset S, Boirie Y, Gaudichon C, Dardevet D, Mosoni L
- P5 Mitochondrial capacity and myosin ATPase activity are impaired in oxidative skeletal muscles in a rat model of cardiac cachexia.
Thibault R, Chanséaume S, Azarnoush K, Guillet C, Giraudet C, Patrac V, Lusson J-R, Cano N, Boirie Y, Walrand S

Pathologies dégénératives cardiovasculaires (F. Capel – C. Gladine)

- P6 Ruminant trans fatty acids intakes and cardiovascular risk factors: A quantitative review of intervention studies.
Marmonier C, Malpuech-Brugere C, Gayet C, Tennehaus-Aziza F, Lamarche B, and Chardigny J-M
- P7 Cocoa flavanol metabolites modulate signaling pathways and expression of genes involved in monocyte adhesion and transendothelial migration.
Claude S, Boby C, Bayle D, Morand C, Milenkovic D
- P8 Cocoa flavanol metabolites act as inhibiting agents on monocyte adhesion to human endothelial cells.
Claude S, Milenkovic D, Gérard N, Mazur A, Morand C
- P9 L'amidon résistant restaure les altérations hépatiques du métabolisme lipidique et glucidique ainsi que l'inflammation. Etude au niveau moléculaire chez le rat insulino-résistant.
Polakof S, Díaz-Rubio M-E, Dardevet D, Scalbert A, Sébédio J-L, Mazur A and Comte B
- P10 PhytoMetaboBank, une nouvelle base de données sur les bioactifs végétaux et leurs métabolites chez l'homme.
Giacomoni F, Rothwell J.A, Fillâtre Y, Knox C, Cesaire D, Quintana M, Lyan B, Sébédio J.-L, Comte B, Pujos-Guillot E, Manach C
- P11 Identification de nouveaux biomarqueurs de consommation du café par une approche métabolomique.
Rothwell J.A. , Fillâtre Y, Touvier M, Lyan B, Martin J.-F, Gueho S, Fezeu L, Arnault N, Sébédio J.-L, Comte B, Hercberg S, Pujos-Guillot E, Galan P, Manach C

Cancers hormono-dépendants (M-C Farge – C. Beaudoin)

- P12 Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or anti-HDAC in breast cancer cell lines.
Dagdemir A, Durif J, Ngollo M, Bignon Y-J, Bernard-Gallon D
- P13 Etude de la marque épigénétique H3K27 triméthylée sur le silencing de gènes impliqués dans le cancer de la prostate
Ngollo M, Durif J, Dagdemir A, Adjakly M, Boiteux J-P, Bignon Y-J, Guy L, Bernard-Gallon D
- P14 Modulation de l'expression au niveau transcriptomique et protéique de SPARC par un traitement cytotoxique ciblé, le Nab-Paclitaxel dans des lignées continues de cancer du sein.
Chalabi N, Tury S, Zahzouh D, Bignon Y-J, Bernard-Gallon D, Nabholz J-M
- P15 Bénéfices de l'immunonutrition sur la fonction immunitaire de patients en radiochimiothérapie pour néoplasies des voies aéro-digestives supérieures
Talvas J, Garrait G, Goncalves-Mendes N, Rouanet J, Vergnaud-Gauduchon J, Kwiatkowski F, Bouteloup C, Bachman P, Bienvenu J, Vasson M-P
- P16 Influence des sécrétions adipocytaires sur les processus de prolifération et d'angiogenèse tumorale.
Bougaret L, Delort L, Lequeux C, Billard H, Dubois V, Damour O, Vasson M-P, Caldefie-Chézet F
- P17 La leptine module l'activité métabolique et cytotoxique des cellules NK.
B. Lamas, Nachat-Kappes R, Rougé S, Vasson M-P, Farges M-C
- P18 Zinc-alpha2-glycoprotéine (ZAG) : facteur de prolifération dans le cancer du sein ?
Delort L, Billard H, Dubois V, Vasson M-P, Caldefie-Chézet F

Tractus gastro-intestinal (S. Blanquet – F. Carvalho)

- P19 Développement et validation d'un nouvel outil de modélisation de l'environnement digestif humain.
Guerra A, Denis S, François O, Chalancon S, Alric M, Blanquet-Diot S
- P20 Folate deficiency leads to CEACAM6 abnormal expression in colonic enterocytes of CEABAC10 mice through a mechanism dependent on HIF binding site methylation.
Denizot J, Darfeuille-Michaud A, Barnich N
- P21 Western diet on CEABAC10 mice induces a specific dysbiosis with increased *Escherichia coli*, modulates innate immune gene expression and favors AIEC colonization promoting inflammation.
Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N
- P22 Exemple d'étude comparative de microbiotes intestinaux à l'aide de la biopuce HuGChip (HUMAN Gut Chip) lors d'une étude nutritionnelle chez le rat.
Privé F, Tottey W, Ounnas F, Demeilliers C, Salen P, Alric M, Peyret P, de Lorgeril M et Brugère J-F
- P23 Corrélation entre la biopuce phylogénétique exploratoire HuGChip (HUMAN Gut Chip) et les méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS) dans l'étude de la diversité du microbiote intestinal humain.
Tottey W, Claesson M, Borrel G, Harris H, Parisot N, Missaoui M, Jaziri F, Alric M, Peyret P, O'Toole P et Brugère J-F

- P24 Effet d'un extrait de marc de raisin (cépage Alicante) dans la prévention d'une inflammation colique chez le rat.
Boussenna A, Joubert-Zakeyh J, Fraisse D, Texier O, Vasson M-P, Felgines C
- P25 L'activation du système du complément pourrait contribuer à l'effet immunostimulant du probiotique Lcr 35 dans l'intestin.
Vareille M, Evrard B, Ponard D, Garcin S, Forestier C, Brachet P, Vasson M-P, Tridon A

COMMUNICATIONS ORALES

La diminution de la concentration tissulaire en glutathion induite par un traitement au paracétamol n'est pas limitée au foie chez le rat.

Carole Mast^{1,2}, Charlotte Joly^{1,2}, Françoise Glomot^{1,2}, Philippe Lhoste^{1,2}, Dominique Dardevet^{1,2}, Isabelle Papet^{1,2}

(1) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine

(2) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Carole.Mast@clermont.inra.fr

Le paracétamol (P) est l'antalgique et antipyrétique le plus prescrit et consommé en France. Sa détoxification hépatique requiert de la cystéine pour la synthèse des métabolites paracétamol-sulfate (P-S), paracétamol-cystéine (P-Cys) et paracétamol-N-Acétyl-Cystéine (P-NAC). La prise de P à haute dose engendre une baisse du GSH hépatique mais peu de données sont disponibles pour les autres tissus. Le but de cette étude est d'étudier les conséquences d'un traitement prolongé à dose thérapeutique de P sur le statut en GSH de plusieurs tissus et organes.

Vingt rats mâles Wistar (4 mois, 405 ± 5g), ont été répartis en 3 groupes. Le témoin (T, n=6) a reçu le régime standard A04 (SAFE). Les groupes 0,5P et 1P ont reçu pendant 17 j le régime A04 supplémenté avec respectivement 0,5 et 1% de P. Les rats ont été placés en cages métaboliques les 3 derniers jours afin de recueillir les urines. Le GSH total a été mesuré par méthode colorimétrique avec recyclage enzymatique. Le P ainsi que ses métabolites : paracétamol-glucuronide (P-G), P-S, P-Cys et P-NAC ont été quantifiés dans les urines par LC/MS (API 2000 AppliedBiosystems/MDS Sciex).

Les activités plasmatiques des transaminases (AST et ALT) n'ont pas révélé de toxicité hépatique. Les concentrations en GSH dans le sang, le foie, l'intestin grêle et le muscle squelettique du groupe 0,5P n'ont pas été différentes de celles du groupe T. En revanche le GSH du groupe 1P a été réduit de 59 %, 20 %, 8 % dans respectivement le foie, l'intestin grêle (IG) et le gastrocnemius ($P < 0,01$) et le GSH sanguin a été augmenté (73 %, $P < 0,001$). Pour le groupe 0,5P, le P a été principalement excrété sous la forme P-S (86%), suivi des formes P-G (6%), P-NAC (4%), P (4%) et P-Cys (0,1%). Pour le groupe 1P la forme P-G a été multipliée par 12, les formes NAC-P et Cys-P par 4 et le P par 3 ($P < 0,001$) alors que la forme P-S n'a pas été modifiée.

Lors de la saturation des deux voies P-S et P-G le GSH chute dans le foie ainsi que l'IG et le muscle alors qu'il augmente dans le sang. Le foie étant le seul organe à assurer la détoxification, les déplétions observées dans IG et le muscle n'y sont pas directement associées. Les mécanismes mis en jeu et les conséquences métaboliques de la modification du statut en GSH restent à étudier dans ces tissus et organes.

Prévention nutritionnelle de l'ostéoporose par un polyphénol, la fisétine: mécanismes d'action

Laurent Léotoing^{1,2,3}, Fabien Wauquier^{1,2,3}, Marie-Jeanne Davicco^{1,2,3}, Patrice Lebecque^{1,2,3}, Sylvie Mercier^{1,2,3}, Jérôme Guicheux^{4,5}, Elisabeth Miot-Noirault^{2,6}, Yohann Wittrant^{1,2,3}, and Véronique Coxam^{1,2,3}

(1) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63009 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

(2) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

(3) Equipe Alimentation, Squelette et Métabolismes

(4) Inserm, UMRS791, LIOAD, group STEP, F- 44042 NANTES, FRANCE

(5) PRES LUNAM, Université de Nantes, UFR Odontologie, 1 Place Alexis Ricordeau, F- 44042 NANTES, France

(6) Inserm, UMR 990, F-63000 CLERMONT-FERRAND

laurent.leotoing@clermont.inra.fr

Chez la femme, le déclin de la fonction ovarienne lors de la ménopause est associé à une induction de cytokines inflammatoires. A cela s'ajoute une inflammation chronique à bas bruit liée au vieillissement. Il est clairement établi que ces cytokines présentent des effets néfastes pour la structure osseuse, en favorisant d'une part la résorption osseuse par les ostéoclastes, et d'autre part, en inhibant la formation osseuse par les ostéoblastes. Dans le cadre d'une thérapeutique limitée et pouvant présenter des effets secondaires indésirables, il paraît intéressant de se tourner vers des stratégies alternatives.

Ainsi, nous avons étudié le potentiel ostéo-protecteur de la fisétine, un polyphénol alimentaire aux propriétés anti-inflammatoires, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires associés. Chez la souris, la consommation de fisétine permet de prévenir la perte osseuse induite par inflammation ou carence estrogénique : la densité minérale osseuse, les paramètres micro-architecturaux ainsi que les marqueurs osseux sont positivement modulés par la fisétine. In vitro, la fisétine réprime la différenciation des ostéoclastes en réponse à l'inducteur RANKL. Elle inhibe la formation des cellules géantes multi-nucléées, leur activité TRAP ainsi que l'expression génique de facteurs de transcription clefs (c-Fos, NFATc1) et de marqueurs de différenciation et d'activité ostéoclastiques. Les mécanismes moléculaires associés sont une répression de la voie NF- κ B d'une part ainsi que des voies p38 MAPK et JNK d'autre part. Pour aller plus loin, nous avons démontré que la fisétine stabilise MKP-1, une phosphatase responsable de la désactivation de p38 MAPK et des JNK. De plus, l'invalidation de MKP-1 par shRNA dans des précurseurs ostéoclastiques annule en partie l'action répressive de la fisétine sur leur différenciation.

La fisétine pourrait ainsi être considérée comme une alternative naturelle permettant de préserver la santé osseuse en inhibant la résorption ostéoclastique.

CO3

Etude protéomique du vieillissement musculaire chez la femme post-ménopausée

Gueugneau M¹, Coudy-Gandilhon C¹, Chambon C¹, Bijlsma A², Maier A², Polge C¹, Taillandier D¹, Combaret L¹, Attaix D¹, Butler-Browne G³, Picard B¹, Béchet D¹

(1) INRA, UMR 1019, UNH & URH, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, 63122 Saint Genes Champanelle, France;

(2) Leiden University Medical Center, Department of Gerontology and Geriatrics, 2333 ZA Leiden, Netherlands;

(3) UMRS 974 - UPMC Paris 6 University / U974 - Inserm / UMR7215 – CNRS, Pitié-Salpêtrière 75651 Paris, France.

marine.gueugneau@clermont.inra.fr

Une approche protéomique a été développée afin identifier de nouveaux biomarqueurs du vieillissement musculaire (sarcopénie). Des extraits totaux et sarcoplasmiques ont été préparés à partir de femmes ménopausées matures (54 ans) et âgées (78 ans). Sur un total de 1919 spots, 133 sont exprimés de façon différentielle chez les femmes âgées par rapport aux femmes matures, et la spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS) a permis d'identifier 74 protéines différentes.

On observe d'importantes modifications du métabolisme énergétique cytosolique (TPIS, PYGM, GPDA, créatine-kinase) et mitochondriale (pyruvate-déshydrogénase, aconitase, COX, NADH-déshydrogénase).

Certaines protéines différentiellement exprimées correspondent à des protéines myofibrillaires (myosine light-chaînes, troponines T, myozenin). Tout ceci peut expliquer les modifications des propriétés contractiles chez la personne âgée. Les autres protéines montrent des perturbations dans les processus de cytoprotection et de détoxification, comme une régulation différentielle de plusieurs chaperons moléculaires (HSPA9, HSPA1A), l'homéostasie ionique (sélénium-binding protein) et le stress du réticulum endoplasmique (sarcalumenin, calséquestrine). De plus, l'expression de protéines impliquées dans la protéolyse est augmentée (VCP, UBA1, Calpain Small subunit-1). Nous avons aussi remarqué une régulation négative des protéines impliquées dans l'édition de l'ARN (apobec2) et la traduction mitochondriale (TuFM).

Pour conclure, plusieurs biomarqueurs identifiés dans cette analyse étaient auparavant non reconnus comme différentiellement exprimés dans le muscle âgé, et peuvent représenter de nouveaux points de départ pour élucider certains des mécanismes de la sarcopénie.

CO4

La teneur hépatique en F4-Neuroprostanes : une variable prédictive majeure de la réduction de la plaque d'athérome

Cécile Gladine¹, Laurie Joumard-Cubizolles¹, Monika Zmojdzian¹, John W Newman^{2,3}, Thierry Durand⁴, Jean-Marie Galano⁴, Céline Demougeot⁵, Olivier Berdeaux^{6,7,8}, Estelle Pujos-Guillot^{1,9}, Andrzej Mazur¹, Blandine Comte¹

(1) INRA, UMR1019, UNH, CRNH AUVERGNE, CLERMONT-FERRAND, CLERMONT UNIVERSITE, UNIVERSITE D'Auvergne, UNITE DE NUTRITION HUMAINE, CLERMONT-FERRAND, FRANCE ; (2) DEPARTMENT OF NUTRITION, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, DAVIS, CA, 95616; (3) USDA, ARS, WESTERN, HUMAN NUTRITION RESEARCH CENTER, DAVIS, CA, 95616; (4) INSTITUT DES BIOMOLECULES MAX MOUSSERON (IBMM), UMR CNRS 5247, UNIVERSITES DE MONTPELLIER I ET II, FRANCE ; (5) EA 4267 FONCTIONS ET DYSFONCTIONS EPITHELIALES, UNIVERSITY OF FRANCHE COMTE, 19 RUE AMBROISE PARE, 25030 BESANCON, FRANCE ; (6) CNRS, UMR6265 CENTRE DES SCIENCES DU GOUT ET DE L'ALIMENTATION, DIJON, FRANCE ; (7) INRA, UMR1324 CENTRE DES SCIENCES DU GOUT ET DE L'ALIMENTATION, DIJON, FRANCE ; (8) UNIVERSITE DE BOURGOGNE, UMR CENTRE DES SCIENCES DU GOUT ET DE L'ALIMENTATION, DIJON, FRANCE ; (9) INRA, UMR 1019, PLATEFORME D'EXPLORATION DU METABOLISME, CLERMONT-FERRAND, FRANCE

cecile.gladine@clermont.inra.fr

Les propriétés athéroprotectrices des acides gras polyinsaturés de type n-3 à longue chaîne (AGPI n-3 LC), et en particulier de l'acide docosahexaénoïque (DHA) ont été largement décrites. Néanmoins, les mécanismes d'action restent encore mal connus. Les recherches se sont récemment orientées vers l'identification des métabolites oxygénés issus des AGPI n-3 LC qui sont de plus en plus considérés comme des effecteurs majeurs de leurs effets athéroprotecteurs. Dans ce contexte, une étude dose-réponse de supplémentation en DHA a été réalisée chez un modèle animal d'athérosclérose (souris LDLR^{-/-}) afin d'étudier les relations entre la progression de la plaque d'athérome et les profils en métabolites oxygénés issus du DHA. La supplémentation en DHA a réduit de façon dose-dépendante la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire (TG plasmatique, $R^2=0.97$, $p=0.01$; Cholestérol plasmatique et hépatique, respectivement $R^2=0.96$, $p<0.01$ et $R^2=0.93$, $p=0.03$) ainsi que l'étendue de la plaque d'athérome ($R^2=0.97$, $p=0.02$). L'analyse des profils lipidomiques a révélé une forte modulation des compositions en acides gras mais également des augmentations substantielles des métabolites oxygénés issus du DHA. Parmi ceux-ci, il faut noter l'augmentation dose-dépendante ($R^2=0.99$, $p<0.01$) des niveaux hépatiques en F4-Neuroprostanes (F4-NP), un métabolite oxygéné issu de la peroxydation du DHA. Par ailleurs, une matrice de corrélation de Pearson intégrant l'ensemble des variables a montré que les F4-NP étaient le paramètre le plus négativement corrélé avec l'étendue de la plaque d'athérome. Pour définir les variables les plus prédictives de la progression de l'athérosclérose, nous avons réalisé une analyse en régression PLS avec l'ensemble des données. Cette analyse confirme que la concentration hépatique en F4-NP représente une variable fortement discriminante pour la répartition des animaux en fonction de l'étendue de leur plaque d'athérome. Enfin, le modèle de prédiction de la plaque d'athérome obtenu ($R^2=0.68$) révèle que l'augmentation des teneurs hépatiques en F4-NP est la variable la plus prédictive de la réduction de la plaque d'athérome. Notre étude suggère donc que les F4-NP issus de la peroxydation du DHA pourraient jouer un rôle dans la prévention de l'athérosclérose.

Utilisation d'une approche métabolomique pour la recherche de nouveaux biomarqueurs de consommation d'aliments d'origine végétale

Fillâtre Y¹, Rothwell JA¹, Touvier M³, Lyan B², Martin J-F², Gueho S³, Fezeu L³, Arnault N³, Sébédio J-L¹, Comte B¹, Hercberg S³, Pujos-Guillot E², Galan P³, Manach C¹

(1)Equipe PhéMaBio, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand-Theix

(2) Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand-Theix

(3) Unité de recherche en épidémiologie nutritionnelle, Université Paris 13, Sorbonne Paris cité, INSERM U557, INRA U1125, CNAM, F-93017 Bobigny

yoann.fillatre@clermont.inra.fr

The “Food metabolome” is the subset of all in vivo metabolites originating from the digestion of food components. Global analyses of these metabolites by high-resolution mass spectrometry, coupled with multivariate statistical methods, allow individuals with different dietary patterns to be distinguished. Further, the comparison of groups of low and high consumers of a given food allows the detection of signals which discriminate these groups and can then be used as a basis for the identification of biomarkers of consumption. As part of the ANR PhenoMeNEp project, such an approach was used to identify and validate potential biomarkers of high fruit and vegetable diet consumption. Using 24 hour dietary recalls and food frequency questionnaire data, 144 high F&V consumers and 66 low consumers were selected from the French SU.VI.MAX2 cohort. Morning spot urine samples from each subject were analyzed by LC/QTOF.

As the choice of the population is a critical step in statistical analysis, a specific population of high and low consumers has been selected for each food based on the distribution of its consumption but also taking into account the correlation of consumption between the different foods. The spectrometric data have been treated statistically either by univariate analysis (ANOVA) and multivariate analysis (PLS). The score plots of the PLS showed a good discrimination of high and low consumers for 17 of the 21 foods. Discrimination appears to be better for those foods consumed in large quantities, frequently and those rich in phytochemicals such as coffee, tea or apple. This data treatment allowed obtaining a list of potential biomarkers based on the ions found to be discriminant both in ANOVA and PLS. These ions will undergo further identification by analysis of ion clusters, querying of online and in-house databases and complementary analysis with a high resolution mass spectrometer LTQ-Orbitrap. Several new biomarkers have already been identified in coffee and chocolate.

CO6

Approche intégrative de la flexibilité métabolique au niveau du foie chez le rat insulino-résistant

**S Polakof^{1,2}, D Dardevet^{1,2}, C Besson^{1,2}, M Larquier^{1,2}, C Joly^{1,2}, J-F Martin^{1,2,3},
A Mazur^{1,2}, J-L Sébédio^{1,2} and B Comte^{1,2}**

(1) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

(2) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

(3) INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, UNH, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Sergio.polakof@clermont.inra.fr

Insulin resistance (IR) is one of the main components of metabolic syndrome. However, the early phases of its development such as the first metabolic alterations preceding its installation remain unclear. In order to analyze the early processes over time from the gene to the metabolite levels, we have pair-fed two groups of rats with either a control (65% starch) or a high-fructose (65% fructose) diets for 45 days. The final phenotype of the fructose-fed group consisted in fasting hyperglycemia, hyperinsulinemia, and IR at the muscle level. Several major changes were also noticed over time before the IR installation: at the molecular level, the liver gene expression profile (90 genes related to lipid and glucose metabolism and insulin signaling) was strongly modified at D5. This shift was quickly compensated and the differences were no longer visible between D12 and D30. Nevertheless, this flexibility was limited over time and after 45 days of fructose feeding the observed profile was identical as at D5, suggesting a final shift of the molecular phenotype possibly linked to IR installation. This hypothesis was further supported by the urine metabolic trajectories of the fructose-fed rats using metabolomics. Finally, at the metabolic level, the fructose-fed phenotype was characterized by a rapid (D5) increase in the lipogenic and gluconeogenic capacities (enzyme activities and gene expression). All together, the events preceding the fructose-induced IR were characterized by an early (D5) shift of the metabolic phenotype (at the molecular and metabolite levels) mainly reflected in a highly-induced hepatic lipogenesis. While the global phenotype partially recovered the initial profile in the middle of the trial (D12-30, concomitantly with hyperglycaemia), a final shift was observed at D45 when IR was fully installed. This phenotype was characterized (despite fasting hyperinsulinemia) by uncontrolled beta-oxidation, gluconeogenesis and impaired insulin signaling.

C07

Cancer de la prostate et modifications de méthylation de l'ADN induites par les phyto-œstrogènes du soja: Analyse globale du méthylome.

**Mawussi Adjakly^{1,2,3}, Marjolaine Ngollo^{1,2,3}, Jean-Paul Boiteux^{3,4},
Yves-Jean Bignon^{1,2,3}, Laurent Guy^{2,3,4}, Dominique Bernard-Gallon^{1,2,3}**

(1) Centre Jean Perrin, LBM GenAuvergne, CBRV, 28 Place Henri Dunant. BP 38 63001 Clermont-Ferrand

(2) ERTICA, EA 4677, Université d'Auvergne. 63001 Clermont-Ferrand, France.

(3) CNRH, 58 rue Montalembert, 63009 Clermont-Ferrand Cedex 01, France.

(4) CHU Gabriel Montpied, Département d'Urologie, 63003 Clermont-Ferrand, France.

madjakly@yahoo.fr

Des études in vitro, réalisées au laboratoire sur des lignées continues de cancer de la prostate ont montré une diminution de la méthylation de nombreux oncosuppresseurs suite au traitement par la génistéine (40µM) et la daidzéine (110µM) pendant 48H. Nous avons aussi mené une étude comparative entre l'effet des phyto-œstrogènes et l'œstradiol sur la méthylation de l'ADN d'un panel de 24 gènes. Cette étude a permis de supposer une régulation des mécanismes épigénétiques par les phyto-œstrogènes via la voie des Récepteurs aux œstrogènes. Afin de mieux préciser cette hypothèse et de connaître toutes les voies impliquées dans l'impact des phyto-œstrogènes sur la méthylation de l'ADN, nous nous sommes intéressés à l'effet des phyto-œstrogènes sur l'ensemble du méthylome. Nous avons utilisé pour cela la technique de l'Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP) et l'hybridation sur puces Human Methylation 244k (G4495A; Agilent).

Les lignées DU-145, PC-3 et LNCaP ont été traitées pendant 48H avec la génistéine, la daidzéine, la 5 azacytidine, un agent déméthylant et la budesonide, un agent méthylant, par comparaison avec des cellules témoins traitées au DMSO. En MeDIP, l'ADN génomique est soniqué et immunoprécipité avec un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement les 5-méthyl cytosines. L'ADN immunoprécipité est ensuite marqué avec un fluorophore et co-hybridé avec l'ADN génomique total (avant précipitation), lui aussi marqué d'une autre couleur sur une puce. Après normalisation, le rapport ADN immunoprécipité sur l'ADN total sera déterminé. Il sera comparé, pour chaque îlot CpG, dans les différents échantillons hybridés sur puces.

L'analyse des données informatiques actuellement en cours montre une action déméthylante importante des phyto-œstrogènes sur une trentaine de gènes dans les 3 lignées. L'identification des groupes fonctionnels des gènes impactés par les phyto-œstrogènes est en cours de réalisation afin de déterminer les principales fonctions modulées par ces molécules.

Ainsi, la génistéine et la daidzéine auraient une action déméthylante qui serait médiée probablement le REβ. L'étude à grande échelle menée actuellement nous permettra de mieux appréhender quels sont les complexes protéiques qui s'établissent au niveau des récepteurs aux œstrogènes pour relayer les actions des phyto-œstrogènes sur la méthylation de l'ADN dans les cellules tumorales humaines de prostate.

CO8

La leptine module in vitro le statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires

Sinda Mahbouli¹, Sophie Ortega¹, Stéphanie Rougé¹, Marie-Paule Vasson^{1,2}, Adrien Rossary¹

(1) Clermont Université, Université d'Auvergne, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH-Auvergne, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France ;

(2) CHU Clermont-Ferrand, Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, CLARA, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

adrien.rossary@udamail.fr

En situation d'obésité, un stress oxydant accru et une réponse inflammatoire à bas bruit sont décrits. Ces événements favorisent l'apparition ou l'aggravation de pathologies chroniques. Cette étude a pour finalité d'évaluer, au niveau des cellules épithéliales mammaires, les effets des sécrétions adipocytaires telle que la leptine sur le statut oxydatif cellulaire et la réponse inflammatoire.

A partir de cellules épithéliales mammaires primaires (HMEC) mises en culture en présence de leptine (10 ou 100 ng/ml), le statut oxydatif est évalué par la production intracellulaire d'ERO (fluorescence) et de glutathion (GSH) par HPLC. Les activités des enzymes glutathion réductase (GR), glutathion transférases (GST) et hème oxygénase (HO) sont déterminées par spectrophotométrie

La leptine augmente la production des ERO chez les HMEC de $100\% \pm 5$ à $111\% \pm 4$ pour 10 ng/ml et $115\% \pm 3$ pour 100 ng/ml.

En présence de 10 ng/ml de leptine, une réponse anti-oxydante est mise en place avec la stimulation de la production de GSH, passant de 84 ± 8 à 550 ± 55 $\mu\text{mol/g}$ de protéines. Dans le même temps, l'activité des enzymes anti-oxydantes augmente de 1 à 6 UI/g pour la GR, de 2 à 4,5 UI/g pour les GST et de 1 à 2 UI/g pour l'HO.

Pour la concentration de 100 ng/ml de leptine, les défenses anti-oxydantes ne sont pas stimulées restant respectivement à 1, 1,8 et 1 UI/g pour la GR, les GST et l'HO, et le glutathion est consommé passant de 84 ± 8 à 67 ± 7 $\mu\text{mol/g}$.

Cette étude in vitro montre que les cellules épithéliales mammaires répondent au signal leptinique. Quelque soit la concentration de leptine, la production des ERO est légèrement augmentée. La réponse anti-oxydante est fortement induite à 10 ng/ml de leptine, alors qu'à 100 ng/ml, concentration similaire à celle rencontrée dans l'obésité, le stress oxydant est majoré. Ainsi, la leptine est un facteur potentiel du stress oxydant en situation d'obésité.

CO9

Criblage de gènes dérégulés par le cholestérol dans la prostate pré-cancéreuse. Implication des récepteurs LXRs.

Hugues de Boussac^{1,2,3,4}, Aurélien JC Pommier^{1,2,3,4}, Julie Dufour^{1,2,3,4}, Jean Marc A Lobaccaro^{1,2,3,4}, Silvère Baron^{1,2,3,4}

(1) Clermont université, université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand;

(2) CNRS, UMR6293, GReD, F-63177 Aubière;

(3) INSERM, UMR1103, GReD, F-63177 Aubière;

(4) Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand

Hugues.DE BOUSSAC@univ-bpclermont.fr
silvere.baron@univ-bpclermont.fr

Les récepteurs nucléaires LXRs (Liver X Receptors) sont des orchestrateurs de la gestion du cholestérol intracellulaire. Ils modulent l'import, l'export et son stockage intracellulaire. Des données épidémiologiques suggèrent un lien entre le taux de cholestérol et le développement du cancer de la prostate. Nous avons voulu comprendre l'implication des LXRs dans ce processus en utilisant un modèle murin invalidé pour ces récepteurs. Les souris WT et LXR-/- ont été nourries pendant cinq semaines avec un régime riche en cholestérol (x60), et les prostates des animaux ont été prélevées. Nous avons observé l'apparition de néoplasie intra-épithéliale, un phénotype caractéristique des premiers stades du cancer de la prostate dans les souris LXR-/-, suggérant l'importance des LXRs dans la prévention de cette maladie. L'analyse du transcriptome a permis de sélectionner un certain nombre de gènes ayant un profil d'expression lié à la présence des LXRs. Les profils d'expression de ces gènes associés à diverses fonctions (signalisation cellulaire, facteurs de transcription, détoxification, E3 ligase...) ont été validés par qPCR. Afin de vérifier si leur modulation était sous le contrôle des LXRs, leur expression a ensuite été analysée sur des prostates de souris traitées avec un agoniste synthétique des LXRs. Cette étude nous a ainsi permis de mettre en évidence des gènes ayant un rôle potentiel dans le développement du cancer de la prostate et dont les niveaux d'expression sont modulés par le cholestérol alimentaire.

Soutiens financiers : ARC, ARTP, Fondations FRM et BNP-Paribas, Région Auvergne, Ligue Auvergne

CO10

***Saccharomyces cerevisiae* prevents adherent-invasive E. Coli-induced increased intestinal permeability and inflammation in the transgenic mouse model expressing CEACAM6**

Sivignon, A. de Vallee, N. Barnich, J. Denizot, P. Vandekerckove, A. Darfeuille-Michaud

Clermont Université, UMR Inserm/ Université d'Auvergne U1071, Unité sous contrat INRA 2018, Clermont-Ferrand, France

arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr

INTRODUCTION: Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) strains associated with ileal Crohn's Disease (CD) are able to adhere to and to invade intestinal epithelial cells and to replicate within macrophages. The highly mannosylated CEACAM6 molecule abnormally expressed at the ileal mucosa of CD patients, acts as a receptor for AIEC bacteria.

AIMS&METHODS: We investigated the ability of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 to prevent AIEC LF82-induced increased intestinal permeability and AIEC LF82 colonization. Probiotic properties of the CNCM I-3856 yeast strain was analyzed in the transgenic CEABAC10 mouse model challenged with AIEC LF82 bacteria. Intestinal permeability was assessed by measuring 4 kDa dextran-FITC flux in serum, barrier integrity was analyzed using biotin tracer experiment and claudin-2 protein immunostaining. Inflammatory response was assessed on colonic tissue by ELISA.

RESULTS: Infection of CEABAC10 mice with AIEC LF82 bacteria led to a significant increase in intestinal permeability and to disruption of mucosal integrity consistent with claudin-2 abnormal expression at the plasma membrane of intestinal epithelial cells. *S. cerevisiae* CNCM I-3856 administered for 10 days before AIEC infection maintained the permeability to a level similar to that of non-infected mice. In addition, this probiotic effect was accompanied by an improvement of the signs of colitis, a decrease in intestinal mucosa injuries and a decrease in pro-inflammatory cytokine release.

CONCLUSION: These findings support the hypothesis that *S. cerevisiae* CNCM I-3856 can be used as probiotic to prevent AIEC colonization, AIEC-induced disrupted intestinal barrier integrity, and subsequent release of pro-inflammatory cytokines.

Régulation de l'inflammation gastrique par l'hème oxygénase-1 lors de l'infection par *Helicobacter pylori*

**Alain P. Gobert^{1,2}, Thomas Verrière², Thibaut de Sablet², Richard M. Peek²,
Rupesh Chaturvedi², Keith T. Wilson²**

(1) UR454 Microbiologie, INRA, centre de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle ;
(2) Division of Gastroenterology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232, USA

alain.gobert@clermont.inra.fr

Introduction : *Helicobacter pylori* est une bactérie pathogène associée au développement de la gastrite chronique, de l'ulcère et du cancer gastrique. *H. pylori* exprime de nombreux facteurs de virulence dont l'oncoprotéine CagA qui est injectée dans les cellules épithéliales par un système de sécrétion de type 4 puis phosphorylée par la kinase c-Src de l'hôte ; phospho-CagA module la signalisation cellulaire, favorisant ainsi la production de chimiokines, dont l'IL-8, et le réarrangement du cytosquelette. L'induction d'une réponse immune mucoale gastrique, notamment caractérisée par la production de monoxyde d'azote (NO), est caractéristique de l'infection par *H. pylori*. L'hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme, induite en réponse à un stress oxydatif ou nitrosant ou par l'hème, qui possède des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Objectif : Etudier l'induction et le rôle de HO-1 lors de l'infection par *H. pylori*. Résultats : NO ou l'hème induisent l'expression de HO-1 dans les cellules épithéliales gastriques par une signalisation impliquant NF- κ B. Lorsque ces cellules exprimant HO-1 ont été infectées par *H. pylori*, nous avons observé une diminution de l'activation de c-Src, de la phosphorylation de CagA, de la production d'IL-8 et de la re-modélisation de l'actine ; ces effets ont été supprimés par un inhibiteur pharmacologique de HO-1 ou par des siRNA HO-1. Des résultats identiques ont été obtenus à partir de cellules transfectées par un plasmide codant pour HO-1. Cependant, lorsque les cellules ont été simultanément traitées par NO et infectées par *H. pylori*, nous avons observé une inhibition de l'activation de NF- κ B et de l'induction de HO-1. Cet effet résulte de l'activation du facteur de transcription HSF1 par la bactérie via la signalisation CagA-ERK1/2 et JNK. Enfin, une diminution de l'expression de HO-1 a été observée chez des patients infectés par *H. pylori* cagA+ et chez des souris infectées expérimentalement. Chez ces animaux, l'augmentation de l'activité de HO-1 au niveau de l'estomac par un traitement à l'hème a permis de réduire l'inflammation gastrique. Conclusion : *H. pylori* favorise la phosphorylation de CagA et donc sa propre pathogénicité en inhibant l'expression de HO-1.

De la mécano-perception du peuplier à la sensibilité viscérale chez la souris : Rôle ubiquitaire du facteur EGR-4 ?

Alison Accarie¹, Loreto Naya-Aquilué^{1,2}, Emilie Chrétien¹, Nathalie Fournier-Blanc², Jun Chao Miao¹, Jean-Louis Junien², Agathe Gelot¹, Denis Ardid¹

(1) UMR INSERM / Uda U1107 Neuro-Dol; Pharmacologie fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand

(2) Equipe MECA – UMR PIAF 547 ; Physique et Physiologie intégrative de l'Arbre Fruitier et Forestier, Aubière

Agathe.Gelot@Udamail.fr

Bien que les acteurs de la mécano-sensibilité soient encore méconnus, la compréhension des mécanismes impliqués dans la perception des stimuli mécaniques est un enjeu crucial, notamment dans le contexte physiopathologique d'une hypersensibilité colique développée chez des patients atteints de douleur viscérale chronique.

Ce symptôme, point d'appel de la majorité des consultations en gastroentérologie, est fréquemment associé à des pathologies telles que les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin mais aussi aux troubles fonctionnels digestifs comme le Syndrome de l'Intestin Irritable. La recherche de facteurs impliqués dans la mécano-perception chez le peuplier a permis à l'équipe MECA de l'UMR PIAF d'identifier un facteur de transcription à deux doigts de zinc, le facteur PtaZFP2. En collaboration avec cette équipe, nous avons analysé la séquence de ce facteur et mis en évidence un homologue chez la souris, le facteur de croissance EGR-4 (ou NGFI-C), dont nous avons analysé la contribution à la mécano-sensibilité du côlon. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié la modulation de l'expression de NGFI-C au niveau des voies nerveuses sensorielles coliques (côlon, ganglions rachidiens dorsaux – DRG, moelle) suite à une distension colorectale. Nos résultats montrent qu'une distension colorectale de 100 µl durant 10 sec induit 1) une diminution de l'expression de NGFI-C au niveau des cellules neuronales entériques, 2) une redistribution membranaire de NGFI-C dans les neurones sensoriels des DRG lombo-sacrés innervant le côlon et, 3) une diminution globale de l'expression de NGFI-C dans la corne dorsale de la moelle épinière. Nos données préliminaires suggèrent l'implication de NGFI-C dans la mécano-sensibilité du côlon et son éventuelle contribution à l'hypersensibilité colique en lien avec la douleur chronique viscérale.

POSTERS

P1

La 1,25 (OH)₂-vitamine D₃ potentialise les effets de la leucine et de l'insuline sur la synthèse protéique au sein des myotubes C2C12

Salles J¹, Chanet A¹, Giraudet C¹, Patrac V¹, Jourdan M², Luiking Y², Verlaan S², Boirie Y¹, Walrand S¹

(1) UNH, UMR 1019 INRA-UdA, Clermont-Ferrand, France

(2) Nutricia Advanced Medical Nutrition, Danone Research, Centre pour la nutrition spécialisée, Wageningen, Pays-Bas

stephane.walrand@clermont.inra.fr

Introduction et but de l'étude : le déficit en vitamine D est très répandu dans la population avec des impacts multiples sur la santé. Ces dernières années, un nombre croissant de données suggère l'existence d'un effet de la vitamine D sur la masse, la qualité et la fonction musculaires, en particulier chez les personnes âgées. Les objectifs de cette étude étaient (1) de caractériser l'effet de la 1,25 (OH)₂-vitamine D₃ (1,25-OHD) sur la synthèse protéique dans des cellules musculaires en culture en condition de stimulation par des facteurs anabolisants (insuline + leucine), et (2) d'identifier les voies de signalisation régulant la synthèse protéique et impliquées dans cet effet.

Matériel et méthodes : après 5 jours de différenciation, des myotubes de la lignée C2C12 ont été incubés pendant 72h dans un milieu DMEM contenant 10nM de 1,25-OHD. Ces cellules ont ensuite été stimulées ou non par un cocktail insuline (100nM) + leucine (5mM) avant l'ajout dans le milieu de puromycine ou d'un traceur isotopique stable (L-[1-¹³C] valine). Le taux de synthèse protéique (FSR) a été déterminé par la quantification de l'incorporation de la puromycine dans les protéines en cours d'élongation (western blot) et par la mesure des enrichissements isotopiques dans les acides aminés libres et les protéines des cellules musculaires. Les niveaux d'expression (ARNm et protéines) des récepteurs de l'insuline (IR) et de la vitamine D (VDR) ont été mesurés (western-blot et RT-qPCR), ainsi que l'état d'activation des intermédiaires des voies de signalisation régulant l'initiation (Akt/PKB, mTOR, S6kinase, S6 et 4EBP1) et l'élongation (eEF2) de la traduction protéique. Un test ANOVA a été utilisé pour l'analyse statistique.

Résultats : la stimulation du FSR des protéines par l'insuline et la leucine était augmentée de 15% en présence de 1,25-OHD et ce quelle que soit la technique utilisée pour mesurer ce paramètre ($p < 0,05$). En outre, l'expression (ARNm et protéines) de l'IR et du VDR était fortement augmentée par la 1,25-OHD. La voie Akt/mTOR était stimulée par l'insuline et la leucine et ce niveau d'activation était augmenté en présence de 1,25-OHD ($p < 0,05$). Néanmoins, alors que l'insuline et la leucine régulaient positivement le facteur d'élongation de la traduction protéique eEF2, aucun effet additionnel de la 1,25-OHD n'était observé.

Conclusion : la 1,25-OHD augmente l'effet stimulant de l'insuline et de la leucine sur une voie de régulation de l'initiation de la traduction protéique (Akt/mTOR), résultant en une activation supplémentaire de la synthèse protéique dans les myotubes C2C12. La sur-stimulation de cette voie résulte en une augmentation supplémentaire de la synthèse protéique dans les myotubes C2C12 en réponse à des facteurs anabolisants. Par conséquent, la 1,25-OHD semble potentialiser l'effet de l'insuline et de la leucine sur l'anabolisme protéique au sein de la cellule musculaire. L'effet de la 1,25-OHD sur les gènes codant pour le IR et pour le VDR pourrait en partie expliquer cette action.

P2

The E2 enzyme UBE2B is implicated in myofibrillar protein degradation in C2C12 myotubes

Roza LEULMI^{1,2}, Agnès CLAUSTRE², Marianne JARZAGUET², Didier ATTAIX^{1,2}, Cécile POLGE², Daniel TAILLANDIER²

(1) Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France,

(2) INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France

roza.leulmi@clermont.inra.fr

Muscle protein loss results from an imbalance between rates of proteolysis and protein synthesis. The ubiquitin proteasome dependent proteolytic system (UPS) is believed to be a major component of muscle protein wasting. This system involves an enzyme cascade E1, E2, E3. E3 enzymes are responsible for selecting protein substrates but E2s generally possess the catalytic activity. The E2-E3 interaction is therefore crucial as it determines life or death of the substrate.

Our main objective is to identify the E2/E3 couples involved in the targeting of myofibrillar proteins in atrophying skeletal muscles. We focused on 13 E2 enzymes that are abundant in the skeletal muscle and/or up-regulated in atrophying skeletal muscles. We determined by qRT-PCR the mRNA levels of these enzymes in catabolic fa-C2C12 myotubes (expressing flag-actin) treated with dexamethasone (Dex, 1 μ M or 0.16 μ M). One μ M Dex increased mRNA levels of UBE2A, UBE2B, UBE2D1, UBE2D2 and UBE2G1. By contrast, only UBE2B mRNAs were up-regulated during mild catabolic conditions (0.16 μ M Dex). To further study the role of UBE2B in myofibrillar protein destabilization, we transfected Dex-treated (1 μ M) fa-C2C12 myotubes with siRNA to knock down UBE2B. This resulted in the stabilization of flag-actin in the soluble fraction (+50 %), and myosin in the soluble and myofibrillar fractions (+67 % and +65 % respectively). We also observed increased amounts of soluble proteins (+93 %). However, a knock-down of the close isoform UBE2A (Dex, 1 μ M) was inefficient for both increasing soluble proteins and stabilizing myofibrillar proteins in catabolic fa-C2C12 myotubes, which strongly suggests an important role of UBE2B in the processing of myofibrillar proteins.

P3

La présence d'une inflammation bas bruit non pathologique chez la personne âgée altère la fonctionnalité musculaire sans affecter la réponse anabolique au repas

Buffière Caroline^{1,2}, Savary-Auzeloux Isabelle^{1,2}, Duclos Martine^{1,2}, Migné Carole^{1,2}, Hercberg S³, Cano Noel^{1,2,4}, Rémond Didier^{1,2} and Dardevet Dominique^{1,2}

(1) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

(2) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND

(3) Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, UMR U 557 Inserm/U 1125

Inra/CNAM/Université Paris, France. hercberg@uren.smbh.univ-paris13.fr

(4) CHU de Clermont-Ferrand

Caroline.Buffiere@clermont.inra.fr

Introduction :

Chez la personne âgée, la sarcopénie a été corrélée à des taux plus élevés de CRP plasmatique. D'autre part, il a été montré qu'une inflammation à bas bruit (LGI) chez le rat génère une résistance du métabolisme protéique musculaire à l'effet anabolique du repas et ainsi participait à la perte de masse musculaire. Le but de cette étude est de déterminer chez la personne âgée si la présence d'une LGI altère également la réponse anabolique au repas et entraîne une perte de fonctionnalité musculaire.

16 hommes âgés (69 ans) en bonne santé présentant (lot LGI : CRP=2,8±0,3 mg/L ; n=10) ou non (lot T : CRP=0,7±0,1 mg/L ; n=6) une inflammation chronique pendant au moins 8 semaines ont reçu une perfusion de ¹³C leucine à l'état post-absorptif (PA) et à l'état post-prandial (PP). Nous avons mesuré la synthèse des protéines, la protéolyse et l'extraction splanchnique des acides aminés au niveau du corps entier ainsi que la synthèse des protéines musculaires et hépatiques (albumine) en réponse au repas et en présence ou non d'une LGI. La force et la puissance musculaires, les performances physiques et la composition corporelle ont également été déterminées.

Résultats :

Aucune différence entre les 2 groupes n'a été mise en évidence en ce qui concerne l'IMC, la masse grasse et la masse musculaire. Au niveau du corps entier, ni les flux de leucine, ni la synthèse protéique (PA : 1,59±0,05 vs 1,57±0,07; PP : 1,66±0,16 vs 1,60±0,07 µmoles/kgFFM/min lot T vs LGI, respectivement), ni la protéolyse, ni l'extraction splanchnique n'ont été altérés par la présence d'une LGI que ce soit à l'état PA ou à l'état PP. De même, aucune différence entre les 2 lots n'a été montrée sur la variation de synthèse musculaire après ingestion du repas. Cependant, la durée du test à l'effort, la puissance développée et la VO₂ max ont été diminuées respectivement de 25, 20 et 23%. (P<0,05) La force musculaire des jambes a également perdu 24% (P<0,1).

Conclusions :

Chez les personnes âgées en bonne santé, la présence d'une inflammation chronique non pathologique est associée à une diminution des performances physiques sans altération de la masse musculaire. Elle ne touche pas la réponse au repas du métabolisme protéique que ce soit au niveau du corps entier ou au niveau musculaire. On peut penser qu'une inflammation plus importante ou plus chronique est nécessaire pour affecter le métabolisme protéique et la masse musculaire mais qu'une LGI est suffisante pour altérer les performances physiques.

P4

Effets du rythme et de la nature des protéines ingérées sur le maintien de la masse maigre pendant une restriction énergétique chez des sujets obèses ou en surpoids

S. Adechian¹, D. Remond¹, C. Migné¹, A. Quinard-Boulangé², A. Maset-Baglieri², S. Rousset¹, Y. Boirie¹, C. Gaudichon², D. Dardevet¹, L. Mosoni¹

(1) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND ; Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

(2) INRA, UMR 0914, UMR INRA / INA-PG / AgroParisTech : Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Alimentation Humaine, Centre de Recherche de Paris, Paris Cédex 05, F-75231, Paris, France.

laurent.mosoni@clermont.inra.fr

Notre but était de déterminer s'il était possible d'induire un meilleur maintien de la masse maigre pendant une restriction énergétique en faisant varier la qualité et le rythme d'apport des protéines. Quatre groupes de sujets obèses ou en surpoids soumis à un régime hypo énergétique de 6 semaines ont été comparés : caséines charge, caséines étalé, protéines solubles de lait (PSL) charge, PSL étalé (n=10 à 11 par groupe). L'essentiel de l'apport protéique journalier était sous forme de caséines dans les groupes caséines, de PSL dans les groupes PSL. Ces protéines étaient réparties en 4 repas par jour dans les proportions 8/80/4/8 % dans les groupes charge ; 25/25/25/25 % dans les groupes étalé. Nous avons mesuré le poids (une fois par semaine), la composition corporelle par impédancemétrie (semaines 0, 1, 3, 6), la perception de faim (semaines 0, 2, 5), des paramètres plasmatiques (cholestérol, triglycérides, glucose, insuline, urée, acides aminés) et les flux de synthèse et de dégradation protéiques corporels (semaine 6). Pendant la restriction énergétique, les volontaires ont perdu $7,5 \pm 0,4$ kg, dont $5,1 \pm 0,2$ kg de masse grasse et $2,2 \pm 0,2$ kg de masse maigre. Cette évolution a été similaire dans tous les groupes. La perception de faim a été différente suivant l'heure des repas, mais pas avant, pendant, et à la fin de la restriction énergétique ; pas de différences entre groupes. Parmi les paramètres plasmatiques, seules les concentrations en acides aminés ont varié de façon significative suivant la protéine ingérée. A la sixième semaine, les mesures du métabolisme protéique ont montré que du fait d'une plus forte inhibition de la protéolyse corporelle et malgré une stimulation moindre de la synthèse protéique, la balance post-prandiale en leucine a été meilleure avec les caséines qu'avec les PSL. Aucun effet rémanent du rythme d'apport n'a été détecté. En conclusion, ni la nature, ni le rythme d'apport des protéines n'ont permis d'induire une différence dans l'évolution de la composition corporelle des sujets. Pourtant, les mesures du métabolisme protéique indiquent un meilleur bilan en leucine avec les caséines lors de la 6^{ème} semaine. Il est possible que cet effet n'apparaisse que tardivement au cours des 6 semaines. Il pourrait donc être utile d'utiliser un régime à base de caséines uniquement à partir de 4 ou 5 semaines de restriction énergétique.

Mitochondrial capacity and myosin ATPase activity are impaired in oxidative skeletal muscles in a rat model of cardiac cachexia

**Ronan Thibault¹⁻³, Sylvain Chanséaume⁴, Kasra Azarnoush⁵, Christelle Guillet^{1,2},
Christophe Giraudet^{1,2}, Véronique Patrac^{1,2}, Jean-René Lusson⁴, Noël Cano¹⁻³,
Yves Boirie¹⁻³, Stéphane Walrand^{1,2}**

(1) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

(2) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND

(3) CHU Clermont-Ferrand, Service de Nutrition Clinique, F-63003 CLERMONT-FERRAND

(4) CHU Clermont-Ferrand, Service de Cardiologie, F-63003 CLERMONT-FERRAND

(5) CHU Clermont-Ferrand, Service de Chirurgie Vasculaire, F-63003 CLERMONT-FERRAND

rthibault@chu-clermontferrand.fr

Introduction and aim: Cardiac cachexia could result from alterations in protein metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscles and myocardium. This study aimed at assessing mitochondrial protein synthesis and enzymatic activity and myosin ATPase activity in different types of muscle fibers in a rat model of cardiac cachexia. Materials and methods: Myocardial infarction and left ventricular dysfunction were induced in seven rats through a surgical ligation of the left coronary artery. Cachexia was defined as a 7.5% loss of initial body weight. Six cachectic rats were age-paired with six control rats. After the infusion of a stable isotope ([¹³C]valine), blood, muscles (soleus, gastrocnemius, tibialis anterior), heart, liver and visceral adipose tissue (VAT) were removed and weighed. The fractional synthesis rates of mitochondrial proteins (FSR) were measured using mass spectrometry. Activities of mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) IV and citrate synthase (CS) and of myosin ATPase were measured by spectrophotometry. Results: Liver weight was significantly higher in the cachectic rats, while weight of soleus, gastrocnemius and VAT were significantly lower. Soleus FSR was higher in cachectic rats (0.516 ± 0.03 %/h vs 0.447 ± 0.046 %/h, $p < 0.05$). COX IV activity was reduced (0.15 ± 0.02 vs 0.28 ± 0.05 $\mu\text{mol/min/mg}$, $P < 0.01$) and increased (0.18 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.03 , $P < 0.05$) in the soleus and liver of cachectic rats, respectively. No change in CS activity of soleus, tibialis, heart and liver was observed. A reduced myosin ATPase activity was measured in oxidative muscles of cachectic rats ($p < 0.05$ versus control rats). Conclusion: Mitochondrial capacity and myosin ATPase activity are impaired in oxidative skeletal muscles in a rat model of cardiac cachexia.

Ruminant trans fatty acids intakes and cardiovascular risk factors: A quantitative review of intervention studies

C Marmonier¹, C Malpuech-Brugere³, C Gayet¹, F Tennehaus-Aziza¹, B Lamarche², and JM Chardigny⁴

(1) Cniel (French Dairy Board), France;

(2) 2Laval University, Québec, Canada,

(3) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France,

(4) 4INRA, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

corinne.malpuech-brugere@udamail.fr

In 2009, the evidence for effects of Trans Fatty Acids (TFA) consumption on coronary heart disease (CHD) was reviewed. The World Health Organization (WHO) concluded that whereas Industrially-produced (IP) TFA negatively impact cardiovascular risk, observational studies do not support adverse CHD effects of ruminant TFA in amounts actually consumed. Moreover this organization ruled that the public health implications of ruminant TFA consumption appeared limited (Mozaffarian et al. 2009). However, there is still debate as to whether R-TFA may influence the risk of cardiovascular disease (CVD).

Regarding discrepancies in literature, we have carried out a meta-analysis from intervention studies, to estimate if CVD risk factors are associated or not with Ruminant TFA intake, on healthy adult volunteers.

Our results clearly demonstrated that ruminant trans fatty acids are not associated with change in TC/HDL-C and therefore are not associated with the risk of coronary heart disease.

Cocoa flavanol metabolites modulate signaling pathways and expression of genes involved in monocyte adhesion and transendothelial migration

S. Claude, C. Bobby, D. Bayle, C. Morand, D. Milenkovic

INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, France.

dragan.milenkovic@clermont.inra.fr

Clinical and experimental studies have demonstrated the role of flavanols from cocoa-derived products in reducing cardiovascular diseases risk. We have shown that plasma flavanol metabolites, at physiologically-relevant concentrations, can reduce monocyte adhesion to endothelial cells without significantly affecting expression of cell adhesion molecules. The goal of this study was to decipher the molecular and cellular mechanisms of flavanol metabolites brought into play.

We investigated the impact of pre-exposure of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to flavanol metabolites on expression of genes using nutrigenomic (non-targeted) approach. This transcriptomic analysis revealed that metabolites can modulate expression of few hundred genes in primary endothelial cells. Bioinformatic analyses revealed that differentially expressed genes are involved in different cellular processes such as cell signalling, cell adhesion, cell junctions or focal adhesion, pathways controlling monocyte adhesion and their transendothelial migration. In agreement with the observed decrease in monocytes adhesion to endothelial cells, expression profile of these genes in response to flavanol metabolites suggests reduction in monocyte adhesion and transendothelial migration. qRT-PCR analysis of 94 target genes related to the identified processes are on-going using low-density arrays. Furthermore, the effect of flavanol metabolites on endothelial cell signalling using western-blot analysis was assessed. The obtained results suggest that flavanol metabolites could regulate expression of genes by acting on p38, c-jun, p65 and FAK phosphorylation pathways. The impact of these metabolites on miRNA expression is under investigation.

In conclusion, this study shows that plasma flavanols metabolites control expression of endothelial genes involved in early steps of atherogenesis through MAPK, NF- κ B and FAK signalling pathways. These results provide insights into cellular and molecular mechanisms of flavanol metabolites underlying their vascular protective properties.

P8

Cocoa flavanol metabolites act as inhibiting agents on monocyte adhesion to human endothelial cells

S. Claude, D. Milenkovic, N. Gérard, A. Mazur, C. Morand

INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, France.

dragan.milenkovic@clermont.inra.fr

Growing evidence suggests that flavonoids play an important role in the health protective effects of plant-derived food and beverages, particularly in reducing cardiovascular diseases risk through an improvement in endothelial function and a modulation of inflammation. Based on human and experimental studies, the demonstration is particularly convincing for flavonoids from cocoa-derived products, namely flavanols. However, little is known about the cellular and molecular mechanisms responsible for the protective effects of these bioactive compounds. The present work examined the impact of the plasma flavanol metabolites on the first steps of atherosclerosis development, namely monocyte adhesion to endothelial cells.

We investigated the impact of flavanol metabolites at 0.2, 0.5, 1, 2 and 10 μ M on monocyte adhesion on TNF α -activated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and on the gene and protein expression of cell adhesion molecules. The circulating metabolites of flavanols used in this study are: catechin (C), epicatechin (EC), 4'methyl-epicatechin (4'MEC), epicatechin-7-glucuronide (EC7G), 4'methyl-epicatechin-7-glucuronide (4'MEC7G) and epicatechin-4'-sulfate (EC4'S). HUVECs were exposed to these metabolites for 3 hours followed by a period of 18 hours without metabolites before performing cell adhesion assay. Among the tested molecules, 4'MEC, 4'MEC7G, EC4'S and EC significantly reduced adhesion at 0.2, 0.5, 1 and/or 2 μ M. EC7G reduced adhesion only when used at 10 μ M while catechin did not affect adhesion efficiency. PCR and western-blot analysis showed that TNF α increased gene and protein expression of ICAM1, VCAM1 and E-SEL. The 3h pre-exposure to 4'MEC7G decreased expression of gene coding for ICAM1 and E-SEL at 0.5 and 1 μ M and EC4'S decreased the expression of E-SEL. At 1 μ M, EC4'S decreased protein expression of E-SEL.

In conclusion, this study showed the biological potency of plasma flavanols metabolites to modulate the adhesion of monocyte to endothelial cells. Their action is probably linked to their capacity to modulate the expression of genes and protein of cell adhesion molecules suggesting that other molecular targets of these metabolites remain to be identified.

**L'amidon résistant restaure les altérations hépatiques du métabolisme lipidique et glucidique ainsi que l'inflammation.
Etude au niveau moléculaire chez le rat insulino-résistant**

Sergio Polakof^{1,2}, M. E. Díaz-Rubio^{1,2}, D. Dardevet^{1,2}, A. Scalbert^{1,2}, J.-L. Sébédio^{1,2}, A. Mazur^{1,2} and B. Comte^{1,2}

- (1) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
(2) INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France
(3) IARC, Lyon, France

Sergio.polakof@clermont.inra.fr

L'état pré-diabétique est fortement lié à l'occidentalisation des régimes et est caractérisé par la résistance à l'insuline (RI) et l'obésité. La consommation de fibres a été montrée ayant un effet positif sur l'intolérance au glucose (IG) et la dyslipidémie associées à la RI. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent peu élucidés et l'implication du foie encore mal connue. Le but de cette étude est de mieux comprendre les changements métaboliques induits par la supplémentation en fibres dans le foie de rats IR nourris avec un régime riche en lipides. Des rats ont été nourris (9 sem) avec un régime contrôle (LF, 5%) ou riche en lipides (HF, 30%), avec ou sans fibres (HFRS, 41% resistant starch, RS). Les rats HF ont un phénotype dyslipidémique avec hyperinsulinémie et hyperglycémie. Le transport de glucose, plus faible dans le groupe HF que dans le LF, est restauré chez les HFRS. La lipogenèse est inhibée chez les rats HF indépendamment de la présence de RS. La glycolyse et la néoglucogenèse sont affectées différemment; diminution des activités enzymatiques clés chez les rats HF, pas chez les HFRS. Les niveaux des ARNm des acteurs de la voie de l'insuline chez les animaux HF sont partiellement restaurés par le RS tandis que les altérations du métabolisme glucidique semblent être régulées par PGC-1 α et C/EBP α . Le régime HF augmente l'expression de gènes de la lipogenèse avec réduction de ceux de l'oxydation des lipides sous un possible contrôle de SREBP-1c, LXR et PPAR α . La stimulation de la lipogenèse est atténuée chez les rats HFRS suite à l'absence de surexpression de SREBP-1c et LXR, avec une inhibition limitée des voies d'oxydation due à l'expression normale de PPAR α . Le groupe HF présente un statut proinflammatoire avec une surexpression des gènes de la voie de NF κ B, STAT3 et TNF- α , qui est atténuée en présence de RS, suggérant un effet protecteur des fibres. Une partie des altérations du métabolisme lipidique et glucidique chez le rat IR a une origine hépatique, notamment en ce qui concerne la lipogenèse et l'oxydation des lipides. L'effet bénéfique de la consommation d'amidon résistant sur la RI peut s'expliquer par une tendance à la normalisation de ces facteurs de transcription. Dans un contexte de forte consommation de lipides, l'inclusion de fibres peut avoir un effet anti-inflammatoire hépatique.

PhytoMetaboBank, une nouvelle base de données sur les bioactifs végétaux et leurs métabolites chez l'homme

Giacomoni F.¹, Rothwell J.A.¹⁻², Fillâtre Y.², Knox C.³, Cesaire D.¹, Quintana M.², Lyan B.¹, Sébédio J.-L.², Comte B.², Pujos-Guillot E.¹, Manach C.²

(1) Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand-Theix

(2) Equipe PhéMaBio, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand-Theix

(3) In SiliFlo Inc, Edmonton, AB T31K2, Canada

claudine.manach@clermont.inra.fr

The “food metabolome” comprises all metabolites present in biological fluids that are directly derived from the digestion of food. A large proportion of the food metabolome consists of phytochemical metabolites, which are products of intestinal, hepatic or microbial metabolism of plant secondary metabolites such as polyphenols, terpenoids, alkaloids... Identification of unknowns in metabolome fingerprints is a laborious step-by-step process and often a bottleneck in biomarker discovery. One major limitation for the interpretation of the Food metabolome fingerprints is the incompleteness of existing databases regarding phytochemical metabolites. As part of the ANR PhenoMeNep project, we aim to construct a new database tailored to the study of the phytochemical component of the food metabolome. Provisionally named PhytoMetaboBank, the database will be an inventory of known metabolites described in the literature for all dietary phytochemicals. It will also include the most likely metabolites predicted in-silico for these dietary phytochemicals. Built with MySQL and Perl processing chains, an efficient relational design will underpin a powerful and intuitive web interface. For a queried monoisotopic mass or elemental formula, the database will return a list of possible metabolites, with their physicochemical properties, spectral data and possible dietary precursors linked to food sources. PhytoMetaboBank will be the first database to collate information on phytochemical metabolites from a metabolomics standpoint, and should improve the identification of discriminant ions in non-targeted profiling.

Identification de nouveaux biomarqueurs de consommation du café par une approche métabolomique

Rothwell J.A.¹, Fillâtre Y.¹, Touvier M.³, Lyan B.², Martin J.-F.², Gueho S.³, Fezeu L.³, Arnault N.³, Sébédio J.-L.¹, Comte B.¹, Hercberg S.³, Pujos-Guillot E.², Galan, P.³, Manach, C.¹

(1)Equipe PhéMaBio, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand-Theix

(2) Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand-Theix

(3) Unité de recherche en épidémiologie nutritionnelle, Université Paris 13, Sorbonne Paris cité, INSERM U557, INRA U1125, CNAM, F-93017 Bobigny

yoann.fillatre@clermont.inra.fr

As part of the ANR PhenoMeNEp project, non-targeted profiling is currently being used to identify and validate potential biomarkers of plant food consumption. Using 24 hour dietary recall and food frequency questionnaire data, 66 high (median 974 grams/day) and 144 low (median 305 grams/day) consumers of fruit and vegetables were selected from the French SU.VI.MAX2 cohort. Morning spot urine samples from each subject were analyzed by QTOF and LTQ-orbitrap mass spectrometry. The consumption data available from the SU.VI.MAX.2 cohort allows the comparison of low and high consumers of specific foods of interest. Coffee, for instance, is one of the most widely consumed beverages in the West and contains various bioactives implicated with health and the prevention of disease. From the SU.VI.MAX pool, the profiles of 25 high coffee consumers (median 180 ml coffee/day) and 20 low coffee consumers (median 0 ml coffee/day) were compared. Metabolomic profiling and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) after orthogonal signal correction filtration (OSC) clearly distinguished low and high coffee consumption and revealed a number of discriminant ions. Some of the most significant discriminants, both by PLS-DA and ANOVA, were found to be metabolites of caffeine, although the non-caffeine derived discriminants observed may be more specific to coffee consumption and are thus may better reflect coffee consumption. Promising new candidate biomarkers were identified such as trigonelline and atractyligenine. The use of samples from cohort study subjects should lead to the discovery of more reliable biomarkers of food consumption than those from intervention study subjects, since biomarkers found this way are not only valid for acute consumption of the food shortly before biofluids are taken. Robust biomarkers of food consumption are potential replacements for self-reported traditional dietary assessment methods, which are subject to considerable bias.

P12

Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or anti-HDAC in breast cancer cell lines

**Aslihan Dagdemir^{1,2,3}, Julie Durif^{1,2,3}, Marjolaine Ngollo^{1,2,3}, Yves-Jean Bignon^{1,2,3},
Dominique Bernard-Gallon^{1,2,3}**

(1) Centre Jean Perrin, LBM GenAuvergne, CBRV, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

(2) ERTICA EA 4677, Université d'Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France

(3) CRNH, 63009 Clermont-Ferrand, France

aslihandagdemir@gmail.com

The isoflavones genistein, daidzein and equol (daidzein metabolite) have been reported to interact with epigenetic modifications, specifically hypermethylation of oncosuppressor genes. The objective of this study was to analyze and understand the mechanisms by which phytoestrogens act on chromatin in breast cancer cell lines.

MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were treated with genistein [18.5 µM], daidzein [78.5 µM], equol [12.8 µM], 17 β-estradiol [10 nM] and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) [1µM] for 48 hours. A control with untreated cells was performed. 17 β-estradiol and anti-HDAC were used to compare their actions with phytoestrogens. The chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled with QPCR was used to follow soy phytoestrogen effects on H3 and H4 histones on H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H4K8ac and H3K4ac marks, and we selected 6 genes (EZH2, BRCA1, ERα, ERβ, SRC3, P300) for analysis.

We demonstrated that soy phytoestrogens induced a decrease of trimethylated marks and an increase of acetylating marks studied with selected genes.

This showed that soy phytoestrogens tend to modify the transcription through the demethylation and acetylation of the histones in breast cancer cell lines.

ETUDE DE LA MARQUE EPIGENETIQUE H3K27 TRIMETHYLEE SUR LE SILENCING DE GENES IMPLIQUES DANS LE CANCER DE LA PROSTATE

**Marjolaine Ngollo^{1,2,3}, Julie Durif^{1,2,3}, Aslihan Dagdemir^{1,2,3}, Mawussi Adjakly^{1,2,3},
Jean-Paul Boiteux^{1,2,3,4}, Yves-Jean Bignon^{1,2,3}, Laurent Guy^{1,2,3,4},
Dominique Bernard-Gallon^{1,2,3}.**

(1) Centre Jean Perrin, LBM GenAuvergne, CBRV, 28 place Henri Dunant, BP 38,63001 Clermont-Ferrand, France

(2) ERTICA EA 4677, Université d'Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France

(3) CNRH, 58 rue Montalembert, 63009 Clermont-Ferrand Cedex 1, France

(4) CHU Gabriel Montpied, Département d'Urologie, 63003 Clermont-Ferrand, France

nmarjolaine@yahoo.fr

Le cancer de la prostate est, en France comme dans la majorité des pays développés, le cancer le plus fréquent chez l'homme. Il repose sur des altérations génétiques et épigénétiques. Les modifications épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Ces altérations épigénétiques modulent l'expression des gènes impliqués dans la carcinogenèse prostatique et de ce fait présente une voie d'étude intéressante. Notre étude porte sur la marque d'histone H3K27me3, mise en place par la protéine EZH2 du groupe polycomb répresseur PRC2. Ainsi nous avons voulu étudier le silencing dû à cette marque répressive dans un certain nombre de gènes impliqués dans le cancer de la prostate : EZH2, RAR β 2, ER α , SRC3, RGMA et PGR. Pour cela, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) suivie d'une Q-PCR, sur 160 biopsies de prostate humaine ont permis d'évaluer la variation d'expression de la marque répressive H3K27 triméthylée entre un groupe de patients sains et un groupe de patients ayant développé un adénocarcinome. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de la marque H3K27 triméthylée ($p < 0.05$) sur les gènes RAR β 2, ER α , RGMA et PGR dans le groupe de patients atteints de cancer de la prostate comparé aux patients sains, tandis que pour le gène EZH2 connu comme étant surexprimé dans le cancer de la prostate, le pourcentage de marques H3K27me3 est très faible dans le groupe des patients ayant un adénocarcinome versus les patients sains. En conclusion, le silencing des gènes cibles d'EZH2 passe par une augmentation des marques H3K27me3 répressives.

Modulation de l'expression au niveau transcriptomique et protéique de SPARC par un traitement cytotoxique ciblé, le Nab-Paclitaxel dans des lignées continues de cancer du sein

**Nasséra Chalabi^{1,2}, Sandrine Tury^{1,2,3}, Dounia Zahzouh^{2,3}, Yves-Jean Bignon^{2,3},
Dominique Bernard-Gallon^{2,3}, Jean-Marc Nabholz^{1,2}**

(1) Division de Recherche Clinique, Centre Jean Perrin, 58 Rue Montalembert, BP 392, 63001 Clermont-Ferrand, France

(2) ERTICA EA 4677, Université d'Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France

(3) LBM GenAuvergne du Centre Jean Perrin, CBRV, 28 Place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

nassera.chalabi@cjp.fr

Les traitements du cancer du sein ont largement évolué ces dernières années notamment avec l'arrivée des Taxanes et des Anthracyclines, standard actuel des polychimiothérapies administrées. Toutefois, avec l'arrivée des thérapies ciblées telles que le Trastuzumab (Herceptin®), le T-DM1 ou encore le Bevacizumab (Avastin®), anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre les protéines HER2 et VEGF, une médecine personnalisée est en train de se mettre en place dans les cancers du sein. La recherche de nouveaux biomarqueurs de plus en plus ciblés reste un des challenges majeurs.

La protéine SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) est une glycoprotéine de 32 kDa surexprimée dans les cancers du sein et associée à une augmentation de la prolifération tumorale et du potentiel métastatique. Cette protéine possède la particularité d'avoir une forte homologie de séquence avec l'albumine ce qui lui confère une affinité de liaison à celle-ci créant ainsi, une accumulation d'albumine dans la tumeur. C'est sur ce mécanisme que repose la stratégie de traitement avec le Nab-paclitaxel. Nanoparticule de 130 nm formée d'un noyau contenant un taxane, le paclitaxel (Taxol®) et d'une enveloppe riche en albumine, le Nab-paclitaxel permettrait une diminution des effets toxiques sur les cellules saines tout en préservant une activité cytotoxique optimale et cela grâce à la présence de l'albumine.

Ce projet a donc consisté à évaluer l'impact d'un tel traitement sur l'expression au niveau de l'ARNm mais aussi de la protéine SPARC. Pour cela, nous avons traité des cellules tumorales mammaires à différentes concentrations de Nab-paclitaxel (12,5 nM et 25 nM) pendant 48h puis extraits les ARN et les protéines. La quantification d'ARNm SPARC a été réalisée par la méthode Taqman® et le dosage de la protéine par western-blotting.

Les résultats observés ont mis en évidence une corrélation inverse entre la présence de récepteurs hormonaux et l'expression tant au niveau ARNm que protéique de SPARC montrant une diminution de la protéine entre 20 % et 80 % selon le statut phénotypique des cellules montrant une corrélation avec le degré d'agressivité de la tumeur.

P15

BENEFICES DE L'IMMUNONUTRITION SUR LA FONCTION IMMUNITAIRE DE PATIENTS EN RADIOCHIMIOThERAPIE POUR NEOPLASIES DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES

J. Talvas¹, G. Garrait¹, N. Goncalves-Mendes¹, J. Rouanet¹, J. Vergnaud-Gauduchon¹, F. Kwiatkowski², C. Bouteloup^{1,3}, P. Bachman⁴, J. Bienvenu⁵, M.P. Vasson^{1,6}

(1) UMR1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH-A, CLARA, Clermont-Fd,

(2) Centre Jean Perrin, Service de Statistiques, Clermont-Fd,

(3) CHRU Estaing, Service de Médecine Digestive, Clermont-Fd,

(4) Centre Léon Bérard, Unité de Nutrition, Lyon,

(5) CH Lyon Sud, Laboratoire d'Immunologie, Lyon,

(6) Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, Clermont-Fd.

jeremie_talvas@udamail.fr

Le but de l'étude est d'évaluer si une nutrition entérale (NE) enrichie en arginine, EPA, DHA, et nucléotides est capable de limiter les effets de la radiochimiothérapie (RCT) sur le statut immunitaire de patients atteints de cancer des voies aériennes aéro-digestives.

28 patients ont été randomisés en 2 groupes recevant en double insu, pendant toute la durée de la RCT, soit une NE enrichie (Impact®, Nestlé) (groupe NEE, n=13), soit une NE standard iso-énergétique iso-azotée (groupe NES, n=15). Le statut immunitaire a été évalué au début (Ji) et à la fin (Jf) de la RCT par la détermination de la production d'ERO par les PNN et de cytokines par les PBMC. Le profil d'expression génique des PBMC a été réalisé par RT-Q-PCR.

Dans le groupe NEE, tandis que le nombre de PNN est réduit entre Ji et Jf, la densité des récepteurs de surface (CD62L, CD15) et la production d'ERO (+30%) sont augmentées. De plus, la composition membranaire en acides gras des PNN est fortement enrichie en EPA (x4.5) et en DHA (x2.5).

La production ex vivo de cytokines anti-inflammatoires (IFN- γ , IL-10) par les PBMC après 48h de stimulation au PHA reste stable dans le groupe NEE alors qu'elle est plus faible à Jf vs Ji dans le groupe NES. La production de TNF α est plus forte à Jf vs Ji dans les 2 groupes alors que celle de PGE2 reste stable dans le groupe NEE mais augmente à Jf dans le groupe NES. L'évolution (Jf vs Ji) du profil transcriptomique des PBMC du groupe NEE montre une induction des gènes de la réponse anti-oxydante (SOD2) et une répression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (IL2, IL10ra).

En conclusion, l'immunonutrition associée à la RCT améliore la fonctionnalité des PNN. De plus, les profils sécrétoire et transcriptomique des PBMC traduisent une limitation de l'inflammation et du stress oxydant induit par la RCT.

P16

Influence des sécrétions adipocytaires sur les processus de prolifération et d'angiogenèse tumorale

L. Bougaret¹, L. Delort¹, C. Lequeux², H. Billard¹, V. Dubois¹, O. Damour², M.-P. Vasson¹, F. Caldefie-Chézet¹

(1) UMR1019 – UNH, EQUIPE ECREIN, UFR Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

(2) Banque de tissus et de cellules, Hôpital Edouard-Herriot, 69437 Lyon

lauriane.bougaret@etu.udamail.fr

L'obésité est un facteur de risque établi de cancer mammaire chez les femmes ménopausées. Au niveau du sein, le tissu adipeux, en contact avec les cellules épithéliales, normales ou tumorales, sécrète des adipokines, dont les concentrations plasmatiques sont modulées en situation d'obésité. Les sécrétions adipocytaires pourraient donc influencer sur les processus de prolifération et d'angiogenèse tumorale. Ainsi, le but de ce projet était de caractériser l'impact des sécrétions adipocytaires issus de femmes minces ou obèses, sur la prolifération tumorale et sur des étapes clés de l'angiogenèse afin de mieux évaluer l'influence de l'obésité sur la progression tumorale ainsi que le dialogue entre adipocytes et cellules tumorales. Pour cela, nous avons recherché in vitro, l'effet i) de sécrétions d'adipocytes matures issus de femmes minces (AM20) ou obèses (AM30) ii) de leur co-culture en présence de cellules cancéreuses (MCF-7), sur la prolifération tumorale (test de fluorescence, résazurine) et sur les étapes de l'angiogenèse (prolifération, migration et formation de tubes endothéliaux par les cellules endothéliales HUVEC). Nos résultats montrent que la prolifération des cellules MCF-7 est augmentée en présence des surnageants (Sn) issus de la culture des AM30 (Sn30) (+50% vs Témoin (T), $p < 0,001$, test de Student), et est majorée lorsqu'elles sont cultivées en contact avec les AM30 (+11% vs Sn30, $p < 0,05$, test de Student). De même, l'angiogenèse est stimulée en situation d'obésité, puisque les Sn30 accroissent la prolifération (+53% vs T, $p < 0,001$, test de Student), la migration (-63% vs T, $p < 0,001$, test de Student) et la formation de tubes endothéliaux, ceci étant majoré avec les surnageants de co-culture. Ainsi, la recherche des adipokines, à l'origine des altérations induisant la progression tumorale s'avère nécessaire afin de les cibler par une stratégie nutritionnelle.

La leptine module l'activité métabolique et cytotoxique des cellules NK

B. Lamas¹, R. Nachat-Kappes¹, S. Rougé¹, M-P. Vasson^{1,2}, M-C. Farges¹

(1) Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Equipe ECREIN, Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-UdA, CLARA, CRNH Auvergne,

(2) Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, Clermont-Ferrand, France

bruno.lamas@u-clermont1.fr

Introduction et but de l'étude : Des récepteurs à la leptine ont été décrits sur les lymphocytes T et les cellules Natural Killer (NK). Ces dernières sont des acteurs majeurs de l'immunité antivirale et anti-tumorale via leur activité cytotoxique associée à l'exocytose des granules lytiques et/ou l'expression de ligand de récepteurs de mort. Les effets de la leptine sur la fonctionnalité de cellules NK humaines ont été étudiés.

Matériel et méthodes : Des cellules NK-92 ont été cultivées pendant 48h en présence de 10 (physiologie, contrôle), 100 (obésité) et 200 (pharmacologique) ng/mL de leptine. L'expression des acteurs cytotoxiques (granzyme B, perforine, TRAIL et Fas-L, western blot), l'activité métabolique (test à la résazurine), la production intracellulaire d'IFN- γ et la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules cibles cancéreuses (cytométrie en flux) ont été quantifiées. (Moyenne $\pm$ SEM, ANOVA 1 voie + PLSD Fisher : $a \neq b \neq c$, $p < 0,05$).

Résultats : La leptine accroît de façon dose-dépendante l'activité métabolique ($UAX10^{-3}$) des cellules NK (100ng/mL : $3,4 \pm 0,2b$; 200ng/mL : $4,9 \pm 0,2c$ vs 10ng/mL : $1,2 \pm 0,1a$) sans affecter la viabilité. A concentrations élevées, elle stimule la cytotoxicité (%) vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 (100ng/mL : $31 \pm 2b$; 200ng/mL : $33 \pm 3b$ vs 10ng/mL : $23 \pm 2a$) et réduit l'activité lytique envers les cellules MCF-7 (100ng/mL : $18 \pm 2a$; 200ng/mL : $13 \pm 2b$ vs 10ng/mL : $15 \pm 1ab$). A 100 ng/mL, la leptine accroît l'expression de TRAIL et inhibe celle de la perforine. La proportion (%) de cellules NK exprimant l'IFN- γ est supérieure aux concentrations élevées de leptine (100ng/mL : $121 \pm 6b$; 200ng/mL : $119 \pm 7b$ vs 10ng/mL : $100 \pm 0a$).

Conclusion : La leptine à 100ng/mL stimule l'activité métabolique des cellules NK et module différemment leur cytotoxicité selon les cibles cellulaires utilisées. L'expression accrue de TRAIL et de l'IFN- γ et la réduction de celle de la perforine pourraient expliquer cet effet.

Zinc-alpha2-glycoprotéine (ZAG) : facteur de prolifération dans le cancer du sein ?

**Laetitia Delort, Hermine Billard, Virginie Dubois, Marie-Paule Vasson,
Florence Caldefie-Chézet**

UMR1019–UNH, Equipe ECREIN, UFR Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

laetitia.delort@udamail.fr

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 les concentrations sériques sont respectivement augmentées et diminuées en cas d'obésité et qui modulent la prolifération de cellules cancéreuses mammaires^{1,2}. La Zinc- α 2-glycoprotéine (ZAG) est une adipokine récemment décrite agissant comme un facteur de mobilisation lipidique. Nous avons récemment montré, par immunohistochimie sur des prélèvements tumoraux, que la ZAG est présente au niveau des cellules cancéreuses mammaires (cancer canalaire invasif et cancer in situ) et des cellules normales avoisinantes mais n'est pas retrouvée au niveau du tissu mammaire de femmes non porteuses de tumeur³.

Ainsi, la ZAG pourrait avoir un rôle dans le développement de la pathologie cancéreuse. Nous avons donc recherché in vitro l'influence de la ZAG sur la prolifération et le processus apoptotique en utilisant différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires, MCF7 (récepteur positif aux œstrogènes [RE+]) et MDA-MB-231 (RE-), ou non cancéreuses MCF10a.

La ZAG semble augmenter la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF7 (+11% à +27% pour des concentrations de ZAG de 5 à 20 μ g/mL) et MDA-MB-231 (+13% avec des concentrations de ZAG égales à 5 μ g/mL). Cependant, la ZAG semble exercer des effets antiprolifératifs au niveau des cellules non cancéreuses MCF10a (-5% à -8% pour des concentrations de 5 à 10 μ g/mL). La ZAG est aussi capable de modifier l'expression génique et protéique de molécules favorisant le processus apoptotique (p53, Bax).

Ces résultats préliminaires suggèrent un rôle potentiel de la ZAG dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires par des mécanismes d'action qui restent encore à élucider.

1.Jardé T, Endocr related Cancer; 2009; 2.Jardé T. Eur J Cancer; 2011 ; 3. Dubois V, Anticancer Res 2010

Développement et validation d'un nouvel outil de modélisation de l'environnement digestif humain

Aurélie Guerra¹, Sylvain Denis¹, Olivier François², Sandrine Chalancon¹, Monique Alric¹, Stéphanie Blanquet-Diot¹

(1) EA 4678 « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament », UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand

(2) Protolab.fr, Optimisation de Prototypes, Clermont-Ferrand

aurelie.guerra@udamail.fr

Les outils de modélisation de l'environnement digestif sont des compléments de plus en plus nécessaires à l'expérimentation animale et humaine. L'Equipe d'Accueil « Conception, Ingénierie et développement de l'Aliment et du Médicament » de l'Université d'Auvergne a mis en place un plateau technologique autour de l'environnement digestif, unique en Europe, associant des outils de dissolution, mastication, digestion, fermentation et absorption à des méthodologies de formulation. Afin de maintenir son avancée technologique dans le domaine de la digestion artificielle, un prototype innovant d'ESomac et INtestin grêle, ESIN, a été développé et est en cours de validation.

Ce nouveau système gastrointestinal dynamique présente des innovations permettant de simuler plus fidèlement les conditions in vivo. En particulier, l'estomac (Alric M. and Denis S. WO2008FR01474, 2007) présente une architecture originale. Le modèle reproduit l'arrivée séquentielle des aliments dans l'estomac et la vidange gastrique différentielle des liquides et solides. De plus, l'utilisation d'un panier pharmaceutique permet de suivre le transit de formes pharmaceutiques dans l'estomac et les 3 compartiments de l'intestin grêle.

La 1ère phase de la validation scientifique d'ESIN a consisté à ajuster les paramètres de digestion in vitro (concentrations en enzymes et sels biliaires, temps de transit) en fonction de données in vivo. Ensuite, des études pharmacologiques ont permis d'évaluer la libération et l'absorption intestinale d'un principe actif formulé connu, le paracétamol, et de valider ces données en comparaison avec les données disponibles chez l'homme. Le modèle sera prochainement utilisé pour des études précliniques de formes galéniques innovantes. En parallèle, des études nutritionnelles (e.g. bioaccessibilité de nutriments) et microbiologiques (e.g. taux de survie de probiotiques) seront menées. L'ensemble de ces études permettra de s'assurer de la pertinence d'ESIN comme outil de prédiction du devenir et du comportement de composés d'intérêt dans l'environnement digestif humain

FOLATE DEFICIENCY LEADS TO CEACAM6 ABNORMAL EXPRESSION IN COLONIC ENTEROCYTES OF CEABAC10 MICE THROUGH A MECHANISM DEPENDENT ON HIF BINDING SITE METHYLATION

J. Denizot, A. Darfeuille-Michaud, N. Barnich

Clermont Université, UMR Inserm/ Université d'Auvergne U1071, Unité sous contrat INRA 2018,
Clermont-Ferrand, France

Nicolas.Barnich@u-clermont1.fr

INTRODUCTION: Abnormal expression of CEACAM6 is observed at the apical surface of the ileal epithelium in Crohn's disease (CD) patients. This allows Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) to colonize gut mucosa, which leads to the development of inflammation. Folate are key vitamins involved in maintenance of DNA methylation patterns in mammals and folate deficiency is often observed in CD patients, especially those with ileal involvement of the disease. Here we investigated molecular mechanisms leading to CEACAM6 abnormal expression in CD patients and focused on the importance of folate in the control of CEACAM6 expression.

AIMS&METHODS: Global methylation status of ceacam6 promoter was analyzed using bisulfite sequencing in ileal or colonic enterocytes. Transcription factor binding on ceacam6 gene promoter was assessed by Chromatin Immunoprecipitation. Transgenic CEABAC10 mice expressing human CEACAM6 were fed with normal or folate deficient diet for 4 weeks before pregnancy, during pregnancy and offspring received the same diet until experiment. Colonic enterocytes were isolated and ceacam6 and hif-1 α expression were measured by RT-qPCR and Western-blot

RESULTS: Two Hypoxia Inductible Factor (HIF)-1 α responsive elements (HRE) containing potentially methylated CpG were identified in ceacam6 gene promoter. HRE-containing CpG were significantly more methylated in intestinal epithelial cells expressing low levels of CEACAM6 (Caco-2 cells) compared to cells showing a high level of CEACAM6 (T84 cells). In parallel, a significant higher level of HIF-1 α binding to HRE in ceacam6 promoter was found in T84 cells compared to Caco-2 cells. Folate deficient-diet led to a significant decrease in methylation levels of CpG-containing HRE in ceacam6 promoter and to HIF-1 α stabilization, which led to CEACAM6 higher expression in colonic enterocytes of CEABAC10 mice.

CONCLUSION: Folate deficiency induces an hypomethylation of HRE-containing CpG in ceacam6 promoter, which correlates with higher CEACAM6 expression. These findings indicate that abnormal CEACAM6 expression in ileal mucosa of CD patients could be related to folate deficiency. Folate enrichment in patients with ileal involvement of the disease could prevent CEACAM6 abnormal expression and subsequent AIEC-mediated inflammation.

WESTERN DIET ON CEABAC10 MICE INDUCES A SPECIFIC DYSBIOSIS WITH INCREASED ESCHERICHIA COLI, MODULATES INNATE IMMUNE GENE EXPRESSION AND FAVORS AIEC COLONIZATION PROMOTING INFLAMMATION

M. Martinez-Medina, J. Denizot, N. Dreux, F. Robin, R. Bonnet, A. Darfeuille-Michaud, N. Barnich

Clermont Université, UMR Inserm/ Université d'Auvergne U1071, Unité sous contrat INRA 2018, Clermont-Ferrand, France

Nicolas.Barnich@u-clermont1.fr

INTRODUCTION: Western diet is a risk factor for inflammatory bowel disease (IBD) and abnormal expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) was observed in Crohn's disease (CD) patients allowing Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) to colonize gut mucosa, leading to inflammation.

AIMS&METHODS: To evaluate the effects of high fat- high sugar (HF/HS) western diet to the intestinal microbiota and host mucosal health status of CEABAC10 mice expressing human CEACAM6, regarding intestinal permeability, barrier and immune function, and inflammation. CEABAC10 and WT mice were treated with conventional or HF/HS diet and a subset of each condition were infected with AIEC strain LF82. Intestinal permeability was assessed by FITC-dextran quantification in serum 5 hours after intragastric administration. Colonic microbiota was studied by 16S rDNA-based denaturing gradient gel electrophoresis, quantitative PCR of specific bacterial groups and deep sequencing with 454-GS-FLX. After infection, AIEC colonization was quantified by colony counting. Inflammation was assessed histologically and by cytokine quantification with ELISA. Host genes expression related to intestinal barrier function and innate immunity was evaluated by RT-qPCR.

RESULTS: HF/HS diet significantly increased intestinal permeability in CEABAC10 mice. HF/HS diet also provoked important alterations in the mucosa-associated microbiota, with increased numbers of E. coli and Bacteroides spp and depletion of total bacteria. E. coli population was specially favored in CEABAC10 background. Interestingly, nod2 and tlr5 mRNA levels were increased in colonic mucosa of CEABAC10 mice with HF/HS diet compared to conventional diet, whereas tff3 and muc2 mRNA level were decreased, indicating an altered barrier and innate immune function. In addition, orally AIEC-infected HF/HS-treated CEABAC10 mice showed increased persistence of LF82 bacteria in stools compared to CEABAC10 receiving conventional food, and the better AIEC colonization correlated with higher release of TNF- α .

CONCLUSION: These results strongly support the multifactorial theory of CD etiology and gives weight to western diet, which modulates innate immune gene expression and microbiota composition favoring AIEC colonization leading to gut inflammation.

Exemple d'étude comparative de microbiotes intestinaux à l'aide de la biopuce HuGChip (HUMAN Gut Chip) lors d'une étude nutritionnelle chez le rat

Florence Privé¹, William Tottey², Fayçal Ounnas¹, Christine Demeilliers¹, Patricia Salen¹, Monique Alric², Pierre Peyret², Michel de Lorgeril¹ et Jean-François Brugère²

- (1) Laboratoire Cœur et Nutrition, TIMC-IMAG CNRS UMR 5525, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France
- (2) EA-4678 CIDAM, Clermont-Université, Université d'Auvergne, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

j-francois.brugere@udamail.fr

Le microbiote intestinal intervient à plusieurs niveaux dans la santé de l'homme-hôte, via la maturation de l'épithélium intestinal, du système immunitaire, la protection contre les pathogènes et de nombreuses fonctions métaboliques comme la digestion de carbohydrates non-digestibles, la production de vitamines,... Il est également impliqué dans de nombreuses maladies, certaines intestinales (MICI, cancer du colon,...), d'autres d'origine métabolique (obésité, maladies cardio-vasculaires,...). Le rat est un modèle animal de choix pour l'étude de ces pathologies.

Ici est rapporté les différences de profil du microbiote autochtone fécal du rat Wistar au cours d'une étude nutritionnelle conduite avec deux régimes différents A et B, en présence ou absence d'un traitement continu, pendant 12 semaines. La biopuce phylogénétique HuGChip (HUMAN Gut Chip) permet la détection des 11 Phyla et des 66 familles taxonomiques détectées dans le colon humain. Elle s'avère efficace dans la mise en évidence des bactéries du microbiote du rat, avec des indices de diversité comparables à ceux mis en évidence chez l'humain. Elle permet l'étude simultanée de 29 microbiotes, tant au niveau de la quantification des phyla que de celle des familles (n=7 rats par expérience, à l'exception de régime A avec traitement, n=8). L'effet régime reste faible sur la composition du microbiote fécal, alors que l'effet « traitement » s'avère important sur chaque régime. Ainsi, des différences significatives sont mises en évidence après analyse des 66 familles microbiennes étudiées, dues à un effet « traitement » et cumulatif « régime + traitement ».

Ainsi, la biopuce HuGChip s'avère un moyen de suivi de microbiote intestinal et fécal en modèle rat, y compris pour des cohortes importantes.

Corrélation entre la biopuce phylogénétique exploratoire HuGChip (HUMAN Gut Chip) et les méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS) dans l'étude de la diversité du microbiote intestinal humain

William Tottey¹, Markus Claesson², Guillaume Borrel¹, Hugh Harris², Nicolas Parisot¹, Mohieddine Missaoui¹, Faouzi Jaziri¹, Monique Alric¹, Pierre Peyret¹, Paul O'Toole² et Jean-François Brugère¹

(1) EA-4678 CIDAM, Clermont-Université, Université d'Auvergne, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

(2) Department of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Cork, Ireland

J-Francois.Brugere@udamail.fr

Le microbiote intestinal humain est un écosystème complexe de plus de 10¹⁴ cellules, présentant une diversité et une variabilité inter-individuelle très importante et que l'on commence juste à déterminer. Un répertoire de plus de 1500 espèces a été décrit et chaque individu présente environ 500 de ces espèces. Il est impliqué dans la santé de l'homme-hôte, via la maturation de l'épithélium intestinal, du système immunitaire, la protection contre les pathogènes et de nombreuses fonctions métaboliques comme la digestion de carbohydrates non-digestibles, la production de vitamines,... A l'inverse, il s'avère également impliqué dans de nombreuses pathologies (MICI, cancer du colon, maladies cardio-vasculaires, obésité,...).

L'étude de la composition du microbiote intestinal humain, de manière exhaustive, repose principalement sur des méthodes moléculaires comme le séquençage de nouvelle génération (NGS, Next Generation Sequencing).

Les résultats présentent la biopuce phylogénétique HuGChip (HUMAN Gut Chip). Cet outil est formé de 3x 4448 sondes, longues de 25 nt, ce qui permet la détection des 11 Phyla et des 66 familles taxonomiques détectées dans le colon humain. Ces sondes ont été déterminées sur la base des 5 meilleures régions discriminantes de chaque groupe de séquence ribosomale 16S. In silico, elles sont spécifiques pour 2447 d'entre elles, redondantes à plusieurs familles pour 82 d'entre elles et exploratoires pour 1919 autres, ce qui permet la mise en évidence et l'affiliation de membres bactériens sans séquences représentatives existantes à ce jour dans les banques. En usage quantitatif, la biopuce HuGChip présente une corrélation élevée avec des données de séquençages de nouvelle génération : ces valeurs sont de l'ordre de $r=0.9$ au niveau phylum, comparativement à 3 études de pyroséquençage de masse du marqueur 16S, et à deux études de métagénomique. Il en est de même au niveau de la famille bactérienne (respectivement une moyenne de $r=0.71$ et $r=0.88$ en études « pyroséquençage 16S » et « métagénomique », selon la base de donnée RDP). Trois Phyla bactériens, les plus abondants, ont également été testés par PCR en temps réel : les valeurs obtenues restent similaires aux trois autres approches, biopuce/pyroséquençage/métagénome : la biopuce HuGChip est donc un auxiliaire pratique, au même titre que les techniques NGS, pour l'étude de la diversité du microbiote intestinal.

Effet d'un extrait de marc de raisin (cépage Alicante) dans la prévention d'une inflammation colique chez le rat

Ahlem Boussenna¹, Juliette Joubert-Zakeyh³, Didier Fraisse¹, Odile Texier¹, Marie-Paule Vasson², Catherine Felgines¹

(1) Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie, UMR 1019, Equipe ECREIN, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand

(2) Laboratoire de Biochimie Biologie Moléculaire et Nutrition, UMR 1019, Equipe ECREIN, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand

(3) Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU Estaing, Clermont-Ferrand

ahlem.boussenna@etu.udamail.fr

Les polyphénols présents dans notre alimentation sont reconnus pour leurs effets préventifs vis-à-vis des pathologies inflammatoires. Cette étude vise à évaluer les effets d'une supplémentation en extrait de marc de raisin riche en polyphénols dans la prévention d'une inflammation colique chimio-induite chez le rat.

Pour cela, des rats Wistar (n=40, 8 rats par groupe) ont été nourris ad libitum durant 21 jours avec un régime semi-synthétique (UPAE, INRA Jouy-en-Josas) seul ou supplémenté avec différentes doses (0,1% ; 0,5% ou 2%) d'extrait de marc de raisin rouge de cépage Alicante (Biosphère, St-Bonnet de Rochefort). L'inflammation colique a été induite par administration de sulfate de dextran sodique (DSS) 4% dans l'eau de boisson pendant les 7 derniers jours. L'inflammation colique a été évaluée par la détermination de paramètres cliniques (Disease Activity Index : DAI), histologiques et biologiques (myélo-peroxydase : MPO, superoxyde dismutase : SOD et cytokines : plateforme Anexplo, Toulouse) au niveau colique.

La consommation de DSS induit une inflammation colique caractérisée par une augmentation du DAI et des atteintes histologiques et une diminution de la longueur du côlon. L'extrait de marc de raisin à la dose de 0,5% limite les atteintes histologiques et le raccourcissement du côlon. L'administration de DSS augmente significativement l'activité de la MPO et diminue celle de la SOD. Ces deux paramètres ne sont pas améliorés par la consommation d'extrait de marc de raisin quelle que soit la dose. L'extrait de marc de raisin à la dose de 0,5% diminue les taux coliques d'IL-1 α et IL-1 β qui étaient augmentés par le DSS.

Ces premiers résultats montrent que la consommation d'extrait de marc de raisin pourrait limiter le développement de l'inflammation colique. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec la société 3inature (St-Bonnet de Rochefort).

L'activation du système du complément pourrait contribuer à l'effet immunostimulant du probiotique Lcr 35 dans l'intestin

**Marjolaine Vareille¹, Bertrand Evrard¹, Denise Ponard², Sophie Garcin¹,
Christiane Forestier³, Patrick Brachet¹, Marie-Paule Vasson¹, Arlette Tridon¹**

- (1) Laboratoire d'Immunologie, Equipe microEnvironnement CellulaiRE, Immunomodulation et Nutrition (ECREIN), Unité de Nutrition Humaine (UNH), UMR 1019 INRA - Université d'Auvergne, Faculté de Médecine & Pharmacie, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand
- (2) Laboratoire d'Immunologie, CHU Grenoble, 38043 Grenoble cédex
- (3) Laboratoire de Bactériologie, Université d'Auvergne, faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand

arlette.tridon@u-udamail.fr

Les probiotiques, microorganismes bénéfiques pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés vivants en quantité suffisante, sont présents dans de nombreux aliments naturels ou enrichis, ou des suppléments nutritionnels. Les probiotiques sont capables de stimuler l'immunité innée et adaptative et ainsi d'optimiser les réponses immunitaires intestinales. Le système du complément est un effecteur de la défense antimicrobienne par activation en cascade de protéines, fortement régulé. Son implication au niveau digestif est peu étudiée, mais certaine : beaucoup de protéines du complément sont synthétisées localement et la plupart des réponses immunitaires sont dépendantes de facteurs activés du complément (réponse B, réponses des cellules dendritiques et des macrophages, différenciation des Ly Th1, Th2, Th17 et Treg). Nous avons utilisé des tests fonctionnels sur des pools de sérums normaux, comme source de protéines du complément, pour évaluer les 3 voies d'activation déclenchées in vitro par un probiotique, le lactobacille Lcr 35. Nous démontrons une consommation de la voie classique (44 %), de la voie alterne (45 %) et de la voie des lectines par un test MBL (mannose binding lectin) (24 %). Nous supposons que la voie classique est activée, non par des Ac immuns de type IgG dans le contexte intestinal, mais soit par des Ac naturels, soit par la fixation de C1q sur le lactobacille. La consommation de la voie alterne reflète un déclenchement possible au contact de la paroi du lactobacille, mais aussi la boucle d'amplification résultant des autres voies. L'activation de la voie des lectines témoigne de la fixation de la MBL sur des résidus glycosylés, également ligands du récepteur DC-SIGN impliqué dans l'interaction de Lcr 35 avec les cellules dendritiques. Nous démontrons que Lcr 35 est un activateur des 3 voies du complément in vitro et ainsi pourrait contribuer à la subinflammation intestinale homéostatique, objectivée entre autres par une réponse de type pro-Th1 et pro-Th17, et nécessaire au fonctionnement optimal du système immunitaire.