



# Bulletin Le des BioTechnologies

Mars 2002 n°193

**Erratum** : la référence du §101 du Bulletin de Février est : *L Nolden et al.; Molecular Microbiology 42 (DEC01) 1281-1295.*

Les numéros de paragraphes manquant dans cette édition "papier" correspondent à des analyses figurant dans la version web.

Le sigle ### correspond à des allègements des paragraphes indiqués, pour lesquels vous pouvez consulter les compléments dans la version web.

## Concepts et Techniques

1. ### Les **annotations de séquences génomiques** ne manquent toujours pas de causer des **surprises**.

Ainsi le gène **hemK** d'*Escherichia coli*, qui fait partie de l'opéron *hemA-prfA-hemK*, a été caractérisé en 1995 comme celui d'une des enzymes de synthèse du **noyau hème**, d'où son nom. **hemA** codant une **glutamyl-tRNA réductase**, assurant la première étape dédiée de la synthèse, HemK étaient supposés fonctionner dans la même voie. Le gène *prfA* ne semblait **pas concerné** car il code le **peptidyl RF1** (Releasing Factor 1).

On pensait que **hemK** codait une sous-unité d'une **protoporphyrinogène oxydase**, celle qui assure l'étape finale de la synthèse. Cette fonction est assignée à ce type de gène dans plusieurs banques de données génomiques, d'abord d'*E.coli* puis, par homologie, dans d'autres organismes. Une recherche BLAST donne de nombreux homologues de HemK et 47 sont annotées comme des protoporphyrine oxydases, mais seulement 7 en sont probablement.

On vient de montrer que c'est de *prfA* qu'il faut le rapprocher. Il code une **glutamine méthyltransférase** des protéines **modulant l'arrêt** de la traduction par les **facteurs de largage**. Deux articles confirment cette fonction: *K Nakahigashi, et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1473-1478* et *V Heurgue-Hamard et al.; The EMBO Journal 21 (15FEB02) 769-778*. Voir le commentaire de *S Clarke; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1104-1106*.

Chez *E.coli*, on trouve deux RFs (RF1 et -2) dont la structure imite les **tARNs** dans la mesure où ils reconnaissent les codons non sens de terminaison de la traduction et donc son arrêt. Voir *M Uno et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (19FEB02) 1819-1824*.

Un autre fait intéressant est le contexte. On retrouve un **contexte peptidique identique** autour d'une **N-4-méthylasparagine** ( $\gamma$ -N-méthylasparagine) dans les **protéines collectrices** des **phycobilisomes** des cyanobactéries et des algues rouges. Les Asn72 des sous-unités  $\beta$  de plusieurs phycocyanines C- et R-, d'allophycocyanines, et des phycocérythines B-, C- et

R sont méthylés et ceci figne les interactions avec le chromatophore de sorte qu'elles soient plus efficaces sur le plan énergétique.

On pensait que l'analyse des séquences en dehors des séquences caractéristiques permettrait de détecter ce qui les rend spécifiques de certains types de réactions. Cela est efficace pour celles qui sont très conservées, mais pas pour celles comme **HemK**. Les choses sont donc manifestement plus compliquées. Sur les 13 meilleures candidates à cette fonction chez la levure, 12 se sont révélées fallacieuses.

Ces erreurs sont inévitables, mais la **correction** des **annotations** n'est, malheureusement, pas une pratique courante, dès lors que la fonction est **biochimiquement vérifiée** ou **infirmée**.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺

2. ### La **glycosylation** des **protéines** a lieu dans le reticulum endoplasmique et elle est affinée dans le Golgi. La glycosylation commence par l'**addition séquentielle** de sept monosaccharides (N-acétylglucosamine-phosphate, N-acétylglucosamine plus cinq mannoses) sur un dérivé lipidique, le **dolichylmonophosphate**, et ceci du côté **cytosolique**. Or la protéine modifiée doit être glycosylée du **côté de la cavité** du reticulum. Le lipide porteur doit donc **basculer d'un côté à l'autre** de la **membrane du reticulum**. La "flippase" responsable vient d'être caractérisée comme la **protéine Rtf1**, comme viennent de le montrer *J Helenius et al.; Nature 415 (24JAN02) 447-450*.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺

3. Beaucoup de processus intracellulaires font intervenir des **associations remodelables** de protéines au sein de complexes, le remodelage permettant une stimulation ou une inhibition de l'activité du complexe. Toute une famille de protéines ressemblant à la sous-unité  $\beta$  de la transducine contiennent des **répétitions** dites **WD-40** car elles contiennent tryptophane et asparagine. Elles interviennent en permettant une association transitoire entre récepteurs et molécules intracellulaires transductrices du signal

dans la cellule. L'US Patent n°6 342 368 (29JAN02) de Stanford indique comment on peut piloter ces actions par l'intervention de peptides de 4 à 50 aminoacides. Le brevet a eu du mal à passer, car il a été déposé en Juin 1995.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

4. Usuellement, le **recyclage organisé** des **protéines** par le système **ubiquitine-protéasome** est **intra-cellulaire**. On vient, cependant, de montrer que, chez le spermatozoïde des ascidies (Urochordés ancêtres lointains des Vertébrés que l'on déguste sous le nom de violets ou bijus dans le Midi), ce système détruit le composant 70 kDa du récepteur ovocytaire **périvitellin** lors de la fécondation, et facilite, ainsi, l'entrée du spermatozoïde. On avait déjà montré que le système ubiquitine-protéasome est **secrété**. Il est donc **fonctionnel hors** de la **cellule**. *H Sawada et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1223-1228.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

5.### La suppression **post transcriptionnelle** de l'expression génique (ou interférence ARN) liée à la présence de petits ARNs doubles brins correspondant à la séquence génique réprimée est l'objet de nombreuses revues et articles (voir le *Bulletin de Juillet 2001 §10*, par exemple). Deux aspects sont abordés, l'analyse fine de ces mécanismes, d'une part, et leur utilisation pour réprimer l'expression de gènes particuliers afin d'en comprendre les fonctions, d'autre part.

Sur le premier point, on sait que ce sont de petits ARNs de 21 à 25 nucléotides qui interviennent. On en vient à des distinctions fines entre les différents types de "silencing" de ce type, entre **small interfering RNAs (siRNAs)** et **small temporal RNAs (stRNAs)**. *D Banerjee et al.; BioEssays 24 (FEB02) 119-129.*

Les **stRNAs** sont distincts des précédents par le fait que leur expression **dépend** du **moment** du **développement**, et les exemples les plus évidents sont les gènes **lin-4** and **let-7** de *Caenorhabditis elegans* (voir le *Bulletin de Février §8*). C'est la dimension **temporelle** de la **régulation** qui est discutée dans l'article de *Banerjee et al.*

Les **siRNAs**, ont été mis en évidence par *A Fire et al. Nature 391 (19FEB98) 806-811*, caractérisés par *T Tuschl et al.; Genes & Development 15 (15DEC99) 3191-3197* et analysés par ce groupe dans *PD Zamore et al.; Cell 101 (31MAR00) 25-33.*

Sur le plan des applications on sait bien les utiliser chez plusieurs animaux. Le système est maintenant bien maîtrisé chez *Caenorhabditis elegans*, où il constitue l'outil standard. Des bibliothèques correspondant aux 19 000 gènes du nématode sont en cours de montage. Il en est de même chez la Drosophile pour des cellules en culture ou sur l'animal entier.

L'intérêt se porte surtout sur les cellules de Mammifères car le "knock down" stable de gènes ciblés par modifications de la séquence n'y est pas praticable. Ceci est dû au fait que la recombinaison **non homologue** est très largement **favorisée** par rapport à la recombinaison **homologue**, la seule permettant un ciblage. Une stratégie antisens est, par

ailleurs, difficilement prédictible. Chez les Mammifères, l'utilisation d'ARNs double-brins est plus délicate (voir le *Bulletin de Juillet 2001 §10*), car on **bloque indifféremment toute la traduction**.

Les **siRNAs** miment les produits des **RNases Dicer-like** sans causer la réponse **globale** et non spécifique amorcée par PKR, probablement du fait de leur taille réduite. En inhibant ainsi l'expression de façon stable, on dispose d'outils pour analyser la fonction d'un gène. La production *in vivo* ces petits ARNs de façon **stable** ne peut qu'être espéré pour le moment. On doit exprimer des ARNs doubles brins d'environ 500 pb et les laisser découper dans la cellule en siRNAs (small interfering RNAs). On y arrive effectivement en **traitant** des **cellules** de souris avec ces ARNs. On peut **prolonger l'interférence** en utilisant des **doubles brins** (même longs) en **épingles à cheveux**. *PJ Paddison et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1443-1448.* Ceci peut faire penser à la pathogénicité des viroïdes (voir le § ).

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

8. Le transfert de gènes par **électroporation** est souvent utilisé à des fins de transformation génétique. On ne sait, cependant, pas grand chose du mécanisme impliqué. Des chercheurs de Toulouse ont réussi à **observer** ce **transfert** à l'échelle **unicellulaire**. La perméabilisation des cellules à l'iodure de propidium a lieu dans la membrane de part et d'autre des électrodes, tandis que celle des plasmides a lieu face à la seule cathode où ils s'agrègent après une impulsion suffisamment longue. Ces agrégats se forment après un pulse de 1 seconde et ne peuvent être dissociés par un courant inversé. Ils persistent durant une dizaine de minutes, après quoi ils ne sont plus accessibles à un colorant spécifique de l'ADNn appliqué à l'extérieur de la cellule. Les complexes diffusent dans le cytoplasme après 30 minutes, et sont présents autour du noyau au bout de 24 heures. *M Golzio et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1292-1297.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

9. Usuellement les transferts de protéines utilisent de larges pores aqueux de la membrane par des complexes protéiques multipériques comme dans le reticulum et les mitochondries, mais aussi pour les toxines de la coqueluche ou du charbon. Le fonctionnement du pore créé par une colicine implique un changement de conformation appréciable, car 35% des 200 acides aminés constituant le pore sont transférés à travers la membrane sous l'effet du potentiel de membrane agissant sur le pore.

Dans le cas des colicines (colicine la ici) le domaine formant le pore comporte 10  $\alpha$ -hélices qui changent de conformation, les hélices 2, 3, 4 et 5 traversent la membrane lors de l'ouverture du pore. Dans le cas de la colicine A utilisée par *SL Slatin et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1286-1291*, on peut transférer, de cette façon, une autre protéine fusionnée avec la colicine de

l'autre côté d'une membrane. Cela a été montré avec deux peptides hydrophiles de 86 et 132 acides aminés insérés dans le segment transféré de la colicine. On avait pu le montrer en biotinylant des acides aminés de la chimère et en révélant leur passage par de l'avidine située de l'autre côté de la membrane. Les auteurs ont utilisé une colicine qui ne forme pas de pores, la colicine E2 (une DNase) sécrétée sous forme

de dimères en association avec sa protéine d'immunité, ImmE2. La protéine d'immunité fonctionne en neutralisant le domaine C-terminal de la colicine E2 avec une affinité comparable à celle du complexe avidine/biotine, et peut donc servir de système de révélation du transfert d'une protéine dans sa conformation fonctionnelle.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

## Les Productions Végétales

### Les gènes et les génomes

10. ### Les problèmes de **duplication** de gènes et de la **polypléidie** ont encore suscité une **revue**. *T Mitchell-Olds et al.; Current Opinion in Plant Biology 5 (FEB02) 74–79*. On peut, en effet, aborder ce problème sur le plan fonctionnel avec les séquences complètes d'*Arabidopsis* et du riz. Des études ont récemment été consacrées à l'**évolution** des **régulations**, aux **fonctions** éventuelles des régions **non codantes** (ce qui est possible quand on dispose des séquences) notamment des séquences régulatrices, et l'effet de la sélection sur les fonctions des protéines. Une large fraction de la divergence des fonctions est certainement adaptative, et devrait permettre de comprendre les fonctions des gènes et des protéines codées.

La revue résume les conclusions sur le problème de l'organisation des gènes les uns par rapport aux autres (synténies, notamment, ou association et ordre de gènes) Des synténies sont souvent observées entre espèces pour des marqueurs moléculaires, mais elles sont souvent masquées par des inversions, additions, délétions, duplications dans les séquences ADN. Pour les gènes ceci est moins gênant. Ainsi chez les **Brassicacées**, l'ordre des gènes est bien conservé d'*Arabidopsis* à *Capsella* et *Brassica* avec une distance évolutive de 10–14 et 16–21 millions d'années respectivement.

Chez les **monocotylédones**, les gènes présentent une bonne colinéarité, mais les régions **intergéniques** ont **beaucoup évolué**, avec, cependant, peu d'inversions et de duplications.

On avait déjà constaté que la localisation et les fonctions moléculaires des **gènes de résistance** au sein des Solanacées sont bien conservées chez la tomate, la pomme de terre, et le poivron, tout en laissant place à une évolution rapide de la spécificité. (voir *RC Grube et al.; Genetics 155 (JUN00) 873–887*). Ceci peut être utilisé, même avec des séquences partielles. On a ainsi, par extrapolation de microsyténies entre *Arabidopsis* et tomate par exemple, identifié dans un clone BAC (chromosome bactérien artificiel) le **locus ovate** de la **tomate**. On peut donc utiliser le génome d'*Arabidopsis*, et on a effectivement constaté une microsyténie, même entre

riz et *Arabidopsis* portant sur cinq chromosomes et sur des ensembles allant jusqu'à 8 gènes colinéaires.

L'analyse des séquences **régulatrices** a été réalisée pour les **promoteurs** des gènes **Chs**, de la chalcone synthase, et *Apetala3* (*MA Koch et al.; Molecular Biology & Evolution 18 (OCT01) 1882–1891*) chez une série de **Crucifères**. On a comparé la réponse à la lumière des différents promoteurs dans des protoplastes d'*Arabidopsis*. Elle est bien conservée. Ce qui est intéressant c'est que la **fonction** est **conservée**, **même si** la **séquence** est **mal conservée**. On l'avait déjà constaté chez la Drosophile. Il faut dire que c'est la fonction qui est sélectionnée, pas la séquence *per se*. Ceci va compliquer la détection des motifs régulateurs. Curieusement des séquences **non transcrites** et, pour l'instant, **sans fonctions régulatrices**, peuvent être **conservées**.

La **fluidité** du génome superposée à ces duplications emboîtées a été évaluée chez *Arabidopsis*. La demi-vie d'un gène individuel dupliqué est de 3,2 millions d'années, et la fréquence de duplication individuelle des gènes est de l'ordre de 0,02 à 0,002 par million d'années. Ce n'est pas négligeable. La survie de gènes dupliqués résulte probablement de la divergence des fonctions qui sont sélectionnées **indépendamment**.

La divergence se traduit finalement par une **barrière reproductive** empêchant l'hybridation. On sait qu'elle existe et que plusieurs QTLs la gouvernent chez le **tourne-sol**, par exemple. La comparaison avec l'évolution parallèle des protéines de surface du spermatozoïde et leurs récepteur à la surface de l'ovocyte a été décrite pour certains animaux comme l'ormeau (*Halyotis*) où la lysine (qui disloque la barrière vitelline de l'ovule) montre une évolution rapide au sein d'espèces sympatriques (cohabitantes). Il y a sélection très forte de certains acides aminés de l'enzyme affectant la spécificité de reconnaissance du récepteur. On sait que la compétition interspécifique entre les grains de pollen joue un rôle de barrière à une hybridation interspécifique chez le tourne-sol et les iris.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

## Le développement

12. ### On trouvera dans *NH Battey et al.; Current Opinion in Plant Biology 5 (FEB02) 62–68*, une analyse du **basculement** du stade **végétatif** vers la **floraison** (floral transition). Il se trouve que bien des analogies peuvent être faites, au niveau moléculaire, avec une autre transition qui est celle du stade juvénile vers le stade adulte (acquisition de la compétence à fleurir). On commence à explorer ce phénomène chez un grand nombre de plantes annuelles où cela est plus facile pour essayer d'extrapoler vers les pérennes.

L'**identité végétative** du méristème caulinaire de la plante est **modifiée** à la **transition juvénile-adulte**. Le méristème prend alors une **identité d'inflorescence**, puis **florale**.

La **notion d'identité** résulte de l'existence des **gènes homéotiques**, c'est à dire de gènes entraînant l'apparition du méristème d'un organe donné à une place normalement occupée par un autre, cas de *LEAFY (LFY)* dont la mutation entraîne l'apparition de méristèmes d'inflorescence à la place d'un méristème floral. Mais on ne sait pas trop bien comment le sort du méristème est canalisé. On sait que *LFY* est indispensable au **développement** d'une **fleur**, mais la **formation** de la **fleur** n'est **pas pré-programmée** du fait de l'action de *LFY* sur le méristème lors de la transition florale. *AGAMOUS (AG)* est **nécessaire** à la formation des **étamines** et des **carpelles** au centre de la fleur, mais on ne sait pas ce qui limite son expression au centre de la fleur, alors que son activateur en amont, *LFY* est capable de le faire dans tout le méristème. On sait que le produit du gène *WUS* assure la **persistance** de la population **méristématique**, mais il coopère avec le produit de *LFY* dans l'**activation d'AG**. On a là une association d'un facteur organisateur du méristème et d'un facteur d'organisation de la fleur.

Sur le plan pratique on a réussi à **réduire** sensiblement le **temps de génération** chez le **citrange** (un hybride de l'orange douce *Citrus sinensis* avec *Poncirus trifoliata*, un oranger à feuille trifoliée à fruits acides tout juste bons à faire de la confiture), voir à ce sujet : *L Peña et al.; Nature Biotechnology 19 (MAR 01) 263-267*. Les auteurs y ont exprimé *LFY* ou *API* de façon permanente, ce qui **réduit la phase juvénile**.

Les **phases** végétative, inflorescence, florale sont organisées au sein du méristème par l'action des gènes **d'identité des méristèmes**. Les phases juvénile et adulte sont régulées globalement par des signaux extérieurs au méristème. Lors de la transition florale, des signaux extérieurs (comme la photopériode) entraînent un basculement majeur qui affecte les primordia existants et l'organisation des méristèmes.

## La Physiologie des Plantes

15. Des chercheurs de Davis et de Seoul montrent que si on cultive le **concombre** de serre à **températures** relativement **élevées** (environ 32°), il **supporte mieux** les **basses températures** (10°) **après récolte**, évitant ainsi plus longtemps les fuites d'ions dans le mésocarpe engendrant la détérioration du fruit. *HM Kang et al.; Postharvest Biology & Technology 24 (JAN02) 49-57*. Il est vraisemblable que le

Il est vraisemblable que signaux extérieurs et gènes d'identité continuent à opérer après la transition florale.

La **floraison** des plantes **pérennes** est donc mal connue. On pense que peu de choses diffèrent entre plantes annuelles et pérennes de ce point de vue. Peut être que la suppression du caractère déterminé des méristèmes (croissance finie dans le temps) suffit. Chez la giroflée *Cheiranthus cheiri* les variations annuelles de la température entraînent la formation de méristèmes axillaires à partir du méristème terminal, qui peuvent avoir une destinée florale ou végétative. Le basculement d'**annuel** à **bisannuel** est probablement assuré par l'activité des gènes qui **régulent** la **période de floraison**. Dans ces deux cas la floraison est unique et la plante meurt après production des graines (le cas le plus spectaculaire est celui des bambous). Mais usuellement les plantes pérennes arrivent, d'une part, à **conserver** des méristèmes **végétatifs** durant la **phase florale**, et d'autre part, à **dissocier** la **floraison** de la **sénescence** de toute la plante. .

Là aussi, on observe des floraisons très espacées et simultanées des arbres après plusieurs années d'un développement végétatif, comme chez les **Diptérocarpacées** d'Indo-Malaisie avec des décalages entre espèces. Il existe donc un mécanisme **empêchant** la **formation** des méristèmes **floraux** lors d'une induction par les signaux extérieurs (ou non). Mais lequel?

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

13. Les feuilles sont la source des signaux commandant le développement des fleurs comme l'ont montré des expériences de la période classique, et de petites molécules comme gibberellines, cytokinines ou le saccharose doivent se déplacer dans la plante via les plasmodesmes et le phloème. L'équipe de P Zambryski a **mesuré** le **flux** de **traceurs** entre **feuilles** et **méristème apical**. Elle avait déjà montré qu'on peut observer une chute transitoire de ce flux au début du développement floral, flux qui reprend lorsque la phase florale est établie. Elle a utilisé la photopériode pour piloter la floraison d'*Arabidopsis* ayant des photopériodes différentes. Dans tous les cas la suspension du trafic est observée au même stade. Il doit correspondre à un **remaniement** de la **sélectivité** des **plasmodesmes**. *A Gisel et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1713-1717*.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

maintien d'une activité anti-oxydante, dans ces conditions, est nécessaire à cette plus grande tolérance non seulement au froid mais également à la lumière.

C'est également le cas des pommes et poires dont les altérations de surface au froid dépendent de la température lors du développement du fruit.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

16. **La patate douce** (*Ipomoea batatas*) est surtout cultivée en Chine comme aliment pour les porcs, mais c'est aussi une source potentielle d'**amidons industriels**. Elle accepte des **sols très pauvres**, ce qui en fait l'intérêt. Des chercheurs japonais de Tsukuba ont obtenu une nouvelle lignée, Kanto 116, donnant un amidon à très faible température de gélification (dissolution de l'amidon le rendant plus sensible aux amylases) avec 51.4-52.6 °C, soit 20° de moins que l'amidon des parents. Ceci est dû à une craquelure des grains et à la présence de chaînes latérales plus courtes qui facilitent la solubilisation. *K Katayama et al.; Starch/Stärke 54 (FEB02) 51-57*. Il n'est pas invraisemblable que l'on dispose bientôt des données moléculaires correspondantes.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

17. Le **tabac**, réputé comme une plante en C3, présente toutefois une photosynthèse de **type C4** dans les **pétioles** et la **tige**. La photosynthèse en C3 couple directement capture de l'énergie lumineuse et réduction du CO2 pour donner un composé en C3 (le phosphoglycérate). Les plantes dites à C4 dissocient dans l'espace la capture de l'énergie lumineuse, et la fixation du carbone, en assurant la capture de l'énergie lumineuse dans le parenchyme foliaire où se forme un composé en C4 (l'oxaloacétate converti, ensuite en malate ou aspartate) et la phase dite obscure de la photosynthèse qui se fait à partir d'une décarboxylation du produit en C4 dans les cellules de la gaine des tissus conducteurs. Ceci permet une **forte concentration** du CO2 au voisinage de la **Rubisco** et donc un bien meilleur rendement théorique de la photosynthèse (au moins dans un environnement chaud et sous une forte illumination, conditions dans lesquelles le CO2 est limitant) en **limitant** l'activité **oxydase** de la Rubisco et donc la **photorespiration**.

Il existe des plantes intermédiaires, dites C3-C4 avec un cycle photorespiratoire qui transmet directement les précurseurs du CO2 du mésophylle vers les cellules de la gaine. On admet également que le CO2 perdu lors de la photorespiration est recapturé et ramené vers la Rubisco des cellules de la gaine.

Le **métabolisme en C4** a dû apparaître **au moins 31 fois**, dans au moins 18 familles de plantes (dont le maïs, parmi une dizaine de milliers d'espèces). Il en existe d'ailleurs trois types différents. On ne sait pas si la voie métabolique, ou la structure caractéristique, des plantes en C4 est apparue en premier.

On vient de montrer une **forte expression** des **enzymes de la voie en C4** dans les cellules **périvasculaires** des **pétioles** et **feuilles du Tabac**. *JM Hibberd et al.; Nature 415 (24JAN02) 451-454*. Les cellules de la gaine sont présentes même chez des plantes en C3 comme le céleri où on voit leur couche verte à l'œil nu (regardez lors de votre prochaine salade de céleri en branches).

Mais dans tous les cas le CO2 entre toujours par les stomates (quand il y en a) avec quelques facéties de l'évolution comme *Stylites andicola* une Isoétacée des lacs d'altitude des Andes (découverte en 1954 et voisine dans sa structure des *Nathorstiana* du Crétacé) où le CO2 est absorbé par les racines, ou *Cuscuta reflexa* (un liseron parasite, mais chlorophyllien) dont

les stomates ont été dévoyés en nectaires extra-floraux, et chez qui le CO2 dérive de la respiration.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

18. Le **riz** est une plante en C3. On aimerait lui donner l'efficacité des **plantes en C4** et de nombreuses tentatives ont eu lieu en ce sens. La **phosphoenolpyruvate carboxylase** (PEP carboxylase) assure la **carboxylation** qui va donner l'**oxaloacétate**. La surexpression de l'enzyme du maïs chez des riz transgéniques a été plusieurs fois tentée (voir *MSB Ku et al; Nature Biotechnology 17 (JAN99) 76-80*, où un groupe de Pullman, Tsukuba et Nagoya a observé, curieusement, une réduction de l'**inhibition** de la **photosynthèse** par l'**oxygène**, due à l'activité **oxygénase** de la Rubisco, ce qui est une des **faiblesses** des plantes en C3, car elle entraîne une perte de CO2 lors de la photorespiration. Celle-ci est due à une limitation de la photosynthèse liée à une **carence en phosphate** entraînée par l'**inefficacité** des enzymes de **recyclage** du phosphate inorganique. Deux des enzymes clés de la synthèse du saccharose, la sucrose phosphate synthase SPS et la fructose 1,6 bisphosphatase (FBPase), et la teneur en saccharose et amidon sont réduites. Cette diminution est certes liée à la carence en phosphate, mais aussi à l'**utilisation accrue** du **triose-phosphate** par la respiration, ce qui va manquer pour la synthèse de saccharose, puis d'amidon.

Toutes les tentatives d'amélioration de l'efficacité globale de la photosynthèse (chez le riz mais aussi chez la pomme de terre) se sont révélées infructueuses. Il reste encore beaucoup de choses à faire pour compléter cette transplantation du gène de la PEP carboxylase.

Deux types de **complications**, au moins, interviennent : la multiplicité des enzymes à transplanter, la répartition anatomique des tâches. Le transfert de deux autres gènes de la voie C4 a été assuré par le groupe de Tomoaki Matsuoka, et on sait déjà que l'expression isolée de l'enzyme malique du maïs est létale pour les riz transformés. Il reste surtout à assurer un développement anatomique adéquat de la feuille. La révélation (voir ci-dessus) que la séparation anatomique préexiste chez le Tabac, et probablement chez d'autres plantes est un pas intéressant (je doute qu'on se lance sur le céleri). Il semble par ailleurs, qu'une forte résistance à la diffusion du CO2 est nécessaire dans les cellules de la gaine chez les plantes en C4 pour alimenter suffisamment la RuBisCO. Cependant l'activité des enzymes détectées chez le Tabac est nettement insuffisante pour que le métabolisme en C4 soit efficace. Chez le riz elle est très élevée.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

19. L'AuxiGro™ d'Emerald BioAgriculture (résultant de la fusion d'**Auxein Corp.** et **Mycotech**) a été essayée pendant trois ans sur de nombreuses plantes. C'est un mélange d'acide **γ-aminobutyrique** et d'**acide glutamique**, dont le mécanisme d'action est plein de présupposés, mais qui semble, néanmoins, être efficace. C'est manifestement un **stimulateur général** du **métabolisme**. Il est déjà autorisé sur pomme de terre, arachide, pastèque, vigne, fraise,

betterave à sucre, haricot et oignon. Il devrait être autorisé sur **amandiers** en Californie, où les essais indiquent un **accroissement d'un tiers** de la **production** après **trois applications**. Elles sont pratiquées à l'ouverture de la fleur, puis à pleine

floraison et enfin à la chute des pétales. Il en faut 4 kilos par hectare. *Industrial Bioprocessing 24 (FEB02)*.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

### Les Symbioses

21. On commence à identifier des facteurs de transcription spécifiques des cellules du **nodule** fixant l'azote et dont la production dépend de signaux de la bactérie. On en a déjà caractérisé deux possédant des MADS-box (des domaines très conservés de 57 aminoacides liant l'ADN) On vient d'en révéler un troisième **ngl9** dont la capacité de la protéine codée à lier l'ADN dépend d'une autre protéine à MADS box protein, **NMH7**. Ces deux gènes sont bien exprimés au tout début de la formation de la fleur. Ce qui indique que la Luzerne engage le **même facteur** pour des services **différents**. *JC Zuccheri et al.; Molecular Plant Microbe Interactions 14 (DEC01) 1463-1467*.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

### Les Pathogènes des Plantes et les Mécanismes de Défense

22. Les **pararétrovirus endogènes** (intégrés dans le génome) constituent des familles de séquences répétées. On sait qu'ils peuvent être **pathogènes**, comme c'est le cas pour le **banana streak virus** (*TNdwora et al.; Virology 255 (15MAR99) 214-220*). On explore maintenant toutes les lignées clonales commercialisées pour en détecter la présence et les éliminer. Cette pathogénicité s'observe quand le génome est intact et **exprimé**. La réplication est déclenchée, dans le cas du **tobacco vein clearing virus** (*BE Lockhard et al.; Journal of General Virology 81 (JUN00) 1579-1585*), par des cultures *in vitro*, ou chez des **hybrides** sous **stress** de culture. Ces pararétrovirus pourraient avoir des fonctions **bénéfiques**. *MF Mette et al.; The EMBO Journal 21 (01FEB02) 461-469*.

Les pararétrovirus endogènes du **Tabac** (TEPRVs). Tous sont constitués de séquences plus ou moins dégénérées et ne sont **plus codantes**. Elles sont, par ailleurs, peu exprimés, mais sont conservés (91-98% d'identité). Aucune forme libre et fonctionnelle n'en est connue. On en conclut que ces séquences sont d'un **bénéfice probable** pour la plante. Ce pourrait être une défense contre les agressions virales. Elles sont méthylées et ne sont pratiquement pas exprimées. L'enhancer (séquence ADN permettant une activation de la transcription) correspondant entraîne une méthylation et une répression de l'expression d'un transgène associé chez le Tabac, mais pas chez d'autres plantes. Chez *Arabidopsis* l'enhancer est particulièrement actif dans les méristèmes des tiges. Il se pourrait donc que le virus qui a dû provenir de *Nicotiana glauca* (un tabac diploïde) et engendrer les TEPRVs infectât les précurseurs des cellules germinales. La structure et le fonctionnement de cet enhancer sont parfaitement conservés chez ces deux espèces. Le mécanisme de défense serait du type PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing) dépendant de l'homologie (voir *V Vance et al.; Science 292 (22JUN01) 2277-2280* analysé dans le *Bulletin d'Août 2001 §37 et 38*).

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

23. Les virus des végétaux procèdent comme les virus des animaux, en essayant de **contrecarrer** les **défenses** des cellules et des organismes qu'ils infectent. Le PTGS induit localement entraîne la production d'un signal diffusant dans toute la plante, qui provoque la destruction d'ARNs homologues de

ceux du signal perçu localement. Les petits ARNs doubles brins (siRNAs et stRNAs, voir le §5) sont les premiers éléments de la cascade, lui conférant sa spécificité, ils sont également actifs transcriptionnellement quand les doubles brins correspondent à un promoteur. Ce sont eux qui disparaissent en présence de HC-Pro (Helper Component-Protease), sans que la production du signal et sa diffusion soit handicapées. On connaît déjà le cas de la **suppression du silencing** dit **PTGS** par la **HC-Pro** des potyvirus (**potato virus Y** en est le prototype), qui n'est pourtant qu'une protéase qui clive une polyprotéine virale en ses éléments fonctionnels, ce qui indique qu'un **des peptides** libérés a une action de ce type. La protéine **p25** du **virus X** de la pomme de terre **empêche** également la production ou la diffusion du **signal**. Mais elle n'est pas capable de le neutraliser une fois le PTGS établi contrairement à ce qui se passe pour HC-Pro.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

24. La **protéine 2b** du **virus** de la **mosaïque du concombre** (CMV) empêche la PTGS elle même localement, ainsi que la diffusion du signal. C'est une protéine virale à localisation nucléaire, qui est donc un suppresseur de PTGS. Ceci a été montré avec un transgène exprimé dans des cellules. La méthylation de transgènes est également abolie. Cette protéine assure la diffusion du virus et interfère donc avec le signal probablement au niveau des plasmodesmes. Contrairement à p25, Cmv2b **inhibe** donc l'activité du **signal mobile** et **interfère** avec la **méthylation** dans le noyau. Elle n'est pas capable de neutraliser un **PTGS établi** dans les organes et tissus anciens, mais le fait dans les tissus jeunes. Sa **cible** est donc **distincte** de celle de **p25**.

On vient de montrer qu'elle n'empêche pas l'initiation du PTGS, quand elle est coexprimée avec un transgène susceptible de donner lieu à suppression. Elle empêche, cependant, le signal de sortir de son site de production, et c'est probablement là son principal mode d'action. Elle intervient vraisemblablement en agissant sur un des composants du signal (???) entraînant la méthylation dans le noyau. *NHS Guo et al.; The EMBO Journal 21 (01FEB02) 398-407*.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

27. Les **viroïdes** sont de petits ARNs (246–401 nucléotides) **circulaires** appariés sur une partie de leur longueur, ce qui en fait un torsade. Ils ne codent rien et dépendent de protéines de la cellule pour se répliquer. Ceci ne les empêche pas de faire de gros dégâts dans certaines cultures.

Parmi les plus de 30 viroïdes caractérisés on peut distinguer deux familles. La plupart appartiennent à celle des pospiviroïdes (le **Potato Spindle Tuber Viroid** ou PSTVd, en est le prototype) qui contiennent une région centrale conservée, et se répliquent dans le **noyau**. Les **Avsunviroïdes** (l'**Avocado Sunblotch Viroid** en est le prototype) ne possèdent pas cette région conservée et se répliquent dans le **chloroplaste** grâce à un ribozyme en marteau (hammerhead ribozymes).

Les viroïdes se répliquent par le procédé du **cercle roulant** pour lequel on connaît deux variantes, symétrique et asymétrique. L'**Avocado sunblotch viroid** (ASBVd), comporte 247 nucléotides et utilise le procédé **symétrique**. C'est à dire que les deux brins de l'ARN répliqué servent de modèles. On constate une plus grande proportion d'un des brins qui est dénommé (+) sans autre justification. Le PSTVd utilise le procédé asymétrique.

L'ASBVd emprunte une **RNA polymérase chloroplastique**, codée par le noyau, qui commence son travail dans une région riche en A-U de chaque brin. Les transcrits ainsi synthétisés en tandem sont égrénés par un **ribozyme endogène** en une forme linéaire qui est, ensuite, circularisée par une ligase.

On cherche à caractériser les constituants cellulaires impliqués, mais leur nature est mal connue du fait des difficultés expérimentales. Des chercheurs de Valencia ont ponté par UV les ARNs avec les protéines éventuellement liées, et ont analysé les complexes ainsi gelés. *JA Daròs et al.; The EMBO Journal 21 (15FEB02) 749-759*. Ils ont détecté deux protéines connues pour être impliquées dans la **stabilisation**, la **maturation** et l'**édition** des **transcrits chloroplastiques** (PARBP33 et PARBP35). PARBP33 se comporte comme une **chaperone** des ARNs qui facilite l'autoclivage par le ribozyme des transcrits multimériques engendrés par le cercle roulant. Cette fonction chaperone existe également chez certains virus à ARN.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

28. Le **Potato spindle tuber viroid** (PSTVd) induit des **sympômes généralisés** chez la **tomate**. On observe l'apparition, chez les plantes infectées, des petits ARNs, siRNAs homologues (voir §5) de la séquence du viroïde, ce qui indique la présence d'une défense de type **PTGS**. Mais ce PTGS ne semble **pas intervenir** dans les **différences** de **sympômes** entre souches atténuées et virulentes. *A Itaya et al.; Molecular Plant Microbe Interactions 14 (NOV01):1332-1334*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

29. Le gène **Pti5** de la tomate code (comme **Pti4** et **Pti6**) un **facteur de transcription** induit par le pathogène *Pseudomonas syringae* pv. Tomato se liant aux **éléments de réponse à l'éthylène** du gène de résistance **Pto**, gène codant une kinase intervenant dans la transduction du signal d'alerte. La surexpression de **Pti5** augmente la résistance, mais il ne provoque pas une augmentation sensible de la réponse et son action consiste surtout à **l'accélérer**. *P He et al.; Molecular Plant Microbe Interactions 14 (DEC01) 1453-1457*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

30. Les produits de trois gènes **dominants d'avirulence** de *Phytophthora infestans* situés sur la partie distale du chromosome VIII (**Avr3-Avr10-Avr11**) signalent sa présence à certaines lignées de **potomme de terre** (celles porteuses des gènes de résistance **R3**, **R10** et **R11**) et leur permettent de développer ses défenses. On vient de montrer qu'une **délétion** de ces locus se trouve dans de nombreux isolats en Hollande et au Mexique. Les souches restant avirulentes sont hémizygotes car *P.infestans* est diploïde. On retrouve cette délétion dans des souches initialement avirulentes conservées depuis longtemps qui devraient les posséder. Ce locus est donc instable et la virulence pourrait rapidement se généraliser. *T van der Lee et al.; Molecular Plant Microbe Interactions 14 (DEC01) 1444-1452*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

31. Les champignons phytopathogènes **obligés** (ne pouvant se cultiver hors de leur hôte), sont très difficiles à analyser sur le plan moléculaire, du fait des difficultés techniques. On vient de montrer que la complémentation de certaines mutations par des gènes de champignons plus faciles à manipuler peut, dans certains cas, pallier cette difficulté. C'est le cas de la compensation d'une délétion du gène de la sous-unité catalytique de la **protéine kinase A cAMP-dépendante** de *Magnaporthe grisea*, parasite non obligé, par un gène du mildiou *Blumeria graminis* (alias *Erysiphe graminis*) f.sp. *hordei* parasite obligé. Le mutant de *M.grisea* est non pathogène, car il ne sait pas former des appressoria. On corrige ce défaut avec le gène de *Blumeria* commandé par le promoteur MPG1. *L Bindslev et al.; Molecular Plant Microbe Interactions 14 (DEC01) 1368-1375*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

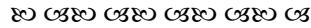
32. Des chercheurs coréens ont utilisé des ESTs (Expressed sequence tags) pour identifier des **gènes** du **riz japonica** classique *Oryza sativa* cv. Nipponbare **induits** lors de l'infection par *Magnaporthe grisea*, et, inversement, les gènes du champignon activés lors d'une infection. Ils sont en train de les identifier par homologies avec les banques de données génomiques. *S Kim et al.; Molecular Plant Microbe Interactions 14 (NOV01) 1340-1346*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

### Les plantes recombinantes

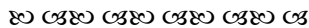
41. La production de **vaccins** dans les **plantes** est encore limitée par la **trop faible expression de l'antigène**.

Une **amélioration** de la **production** d'un **vaccin** contre la **fièvre aphteuse** dans les plantes est décrite par des chercheurs argentins. La production dépendant du site aléatoire d'insertion du transgène, il faut **pouvoir cribler un grand nombre de plantes transformées**. Les auteurs fusionnent la séquence d'un épitope très immunogène de la protéine virale VP1 (VP135-160) avec le **marqueur β-glucuronidase**. Ils ont utilisé la luzerne dont des extraits sont ingérés sans purification par des souris. La glucuronidase ne gêne apparemment pas l'immunisation *MJ Dus Santos et al.; Vaccine 20 (15JAN02) 1141-1147.*

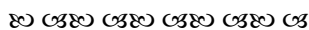


## Les Insectes et leur Maîtrise

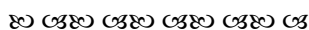
42. Utilisant la luciférase comme marqueur, on vient de montrer que la **présence** d'un **intron** **améliore** très sensiblement (12 à 60 fois) l'**expression** d'un **transgène** dans des cellules C6/36 d'*Aedes albopictus*. Il doit être orienté dans le bon sens et placé en amont de la phase codant la luciférase. L'expression dépend strictement de l'épissage de l'intron. *H Zieler et al.; Insect Molecular Biology 11 (FEB02) 87-95.*



43. La lignée germinale de la mouche *Lucilia cuprina*, plaie des troupeaux de moutons australiens, a été transformée grâce au transposon *piggyBac* de *Trichoplusia ni*. On devrait ainsi pouvoir produire en masse des mâles stériles. *JC Heinrich et al.; Insect Molecular Biology 11 (FEB02) 1-10.* Les auteurs ont utilisé la même technique avec le marqueur EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) que les américains d'Atlanta avec *Anopheles gambiae* (*GL Grossman et al.; Insect Molecular Biology 10 (JUN01) 597-604*), ou la mouche caribéenne des fruits, *Anastrepha suspensa* (voir la revue de *s AM Handler; Insect Biochemistry & Molecular Biology 31 (FEB01) 111-128* et le Bulletin d'Avril 2001).



44. Les populations **est-** et **sud-africaines** de la mouche **tsétsé** *Glossina pallidipes* montrent qu'il a dû y avoir un goulet d'étranglement évolutif pour les plus méridionales, mais qu'elles ont quand même conservé une diversité allozymique. Les **échanges génétiques** entre populations sont **curieusement réduits**. *ES Krafsur; Insect Molecular Biology 11 (FEB02) 37-45.*



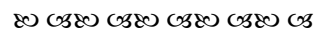
45. Les **populations**, en Afrique de l'Ouest, d'*Anopheles gambiae*, le vecteur du **paludisme** dans ces régions, sont très complexes, avec de multiples sous-populations sympatriques (cohabitant dans un même lieu et pouvant forniquer si cela est biologiquement possible). On parle donc de formes chromosomiques et on cherche à délimiter les taxons cryptiques au sein du complexe. On se pose, en effet, bien des questions sur les flux de gènes entre ces populations.

Les populations d'*A.gambiae* de la forme des forêts au Cameroun comporte les deux formes chromosomiques M et S (Mopti et Savanna, si j'ai bien compris). Cette dénomination est liée à un polymorphisme d'inversions du chromosome 2 (là aussi si j'ai bien compris). L'analyse des microsatellites sur **plusieurs chromosomes** montre

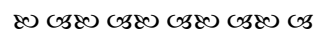
que la différenciation des deux génomes est accusée dans **tout le génome** entre les deux formes et dans un même village. *C Wondji et al.; Insect Molecular Biology 11 (FEB02) 11-19.* Les auteurs concluent que les deux formes moléculaires sont des espèces **séparées** qui **viennent de diverger**.

On avait déjà observé cette situation en Côte d'Ivoire. Les inversions semblent, cependant, avoir plutôt un rôle dans l'adaptation au milieu que dans le choix des partenaires sexuels. *A dellaTorre et al.; Insect Molecular Biology 10 (FEB01) 9-18.* La discussion porte actuellement sur le fait que la très **grande homogénéité** des génomes, aux inversions près, entre les deux formes est due, **soit à un flux de gènes** encore important, ou, au contraire, au fait que si la spéciation a déjà eu lieu, elle est **trop récente** pour donner lieu à une **divergence notable**. En effet, on a pu montrer que les spermatozoïdes portés par les femelles d'une zone du Mali, cette fois, indiquent au moins des appariements entre les formes M et S. *F Tripet et al.; Molecular Ecology 10 (JUL01) 1725-1732.* Ces derniers auteurs constatent également la **présence d'hybrides** dans leurs échantillons.

*G Gentile et al.; Insect Molecular Biology 10 (JAN01) 25-32* avaient bien séquencé des bouts de chromosomes et de génome mitochondrial sans trouver de différences notables entre les deux formes. La seule différence notable portait sur les ITS (Internal Transcribed Spacer) des ADNs codant les ARNs ribosomiaux, sites classiques de variabilité neutre, pour qui deux séquences différant en trois sites correspondent aux formes S et M sont décelables. Malheureusement la différence n'est perceptible qu'au Mali et au Burkina Faso. Les résultats sont quand même encore bien vaseux. On peut certes dire que ce n'est sûrement pas une grande espèce panmictique, mais au delà...



47. Les insectes rencontrent continuellement des toxines diverses dans la nature et ont développé des résistances. C'est le cas de la *Drosophile* qui est facile à utiliser. Une **revue** sur les **résistances multiples** développées dans les populations **naturelles** de la mouche. Chez celles-ci, qui pourtant ne sont pas normalement ciblées par les insecticides, les allèles de résistance persistent à forte fréquence. On peut y étudier commodément ces mécanismes. Ce n'est cependant **pas un modèle universel**, car on n'a jamais pu y déceler des mécanismes comme l'**amplification génique**, par exemple. *TG Wilson et al.; Annual Review of Entomology 46 (2001) 545-571.*



48. Les **glucosinolates** du **chou** sont destinés à **repousser** les **insectes**, ce qui explique que les éliminer n'est pas sans conséquences pour la résistance des plantes. Le puceron *Brevicoryne brassicae* s'en débarrasse en produisant un **myrosinase** (glucosides hydrolase). La lysine 173 et l'arginine 312 sont critiques pour l'hydrolyse. *AM Jones et al.; Insect Biochemistry & Molecular Biology 32 (MAR02) 275-284.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

49. On peut fortement **stimuler** l'**appétit** du **ver** à **soie** *Bombyx mori* et améliorer son efficacité alimentaire en lui faisant avaler du **leucine méthyl ester** qui accroît fortement l'absorption de la plupart des aminoacides par les cellules intestinales. On accélère ainsi la croissance de la chenille et la taille est également nettement accrue. *MG Leonardi et al.; Archives of Insect Biochemistry & Physiology 48 (DEC01) 190-198.* On réduit, par ailleurs très sensiblement les besoins en poudre de feuilles de mûrier.

Il va falloir que j'ouvre un chapitre sur les probiotiques pour insectes.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

50. Le cDNA d'un transporteur d'octopamine à haute affinité a été cloné chez *Trichoplusia ni*. Il est surtout exprimé dans le système nerveux. Ses caractéristiques en font une cible potentielle d'**insecticides neurotoxiques**. *T Malutan et al.; Insect Biochemistry & Molecular Biology 32 (MAR02) 343-357.*

La lignée classique de cellules d'insectes **Sf9**, dérivée de *Spodoptera frugiperda*, montre qu'il existe deux récepteurs de l'octopamine. Ces deux voies convergent vers l'adénylate cyclase qui est stimulée. *J Nasman et al.; Insect Biochemistry & Molecular Biology 32 (MAR02) 285-293.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

51. Des chercheurs grecs ont caractérisé l'**expression** de deux gènes de **chitine synthase** (ChSA et ChSB) de la **Drosophile** durant la **métamorphose**. Ces gènes sont localisés de part et d'autre du centromère du chromosome III dont ils sont très proches. Ils sont **brutalement induits** dès que le **pic d'ecdysone s'achève**. *ME Gagou et al.; Insect Biochemistry & Molecular Biology 32 (FEB02) 141-146.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

52. Un cDNA de l'**hormone prothoracicotrope** (PTTH) du papillon *Hyalophora cecropia* a été caractérisé par des chercheurs tchèques. Sa séquence est identique à 90% à celle de *Samia cynthia ricini* et code une préprohormone de 240 aminoacides. La comparaison des hormones de *H. cecropia*, *S. c. ricini*, *Antheraea pernyi* et *Bombyx mori* indique une **évolution accélérée** de cette protéine. Alors que celle, parallèle, du récepteur n'est probablement pas aussi rapide. La fonction de cette hormone doit dépendre d'un petit nombre d'acides aminés conférant la forme de la protéine. *F Sehnal et al.; Insect Biochemistry & Molecular Biology 32 (FEB02) 233-237.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

54. L'hémiptère *Matsumuratettix hiroglyphicus* n'est pas qu'un simple vecteur passif du phytoplasme de la chlorose de la canne à sucre. Il est, en effet, transmis de façon transovarienne et infecte de nombreux tissus de l'insecte. *Y Hanboonsong et al.; Insect Molecular Biology 11 (FEB02) 97-103.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

55. L'**odorat** joue un très grand rôle dans les **préférences d'hôte** des **moustiques**. *Anopheles gambiae* possède au moins quatre gènes intervenant dans l'odorat et codant vraisemblablement des **récepteurs**. Ils codent des protéines à sept domaines transmembranaires. L'un de ces récepteurs est exprimé spécifiquement dans l'antenne des femelles. Son expression disparaît 12 heures après le repas de sang. *AN Fox et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98 (04DEC01) 14693-14697.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

## Les Biopesticides

56. La guêpe ectoparasite *Eulophus pennicornis* attaque les chenilles de *Lacanobia oleracea*. Les insectes luttent contre des agressions biotiques, comme la présence de cellules étrangères, par la formation d'une capsule d'hémocytes empilés se nécrosant en sécrétant des phénols entraînant une mélanisation. Cette **encapsulation** des parasites et pathogènes est une défense classique contre lesquelles les parasites doivent se prémunir. *E. pennicornis supprime* cette **défense**. On constate une modification des protéines plasmatiques de l'hôte, mais surtout l'incapacité des hémocytes de s'agglutiner et de s'aplatir sur un objet étranger après la pénétration du parasite. Le cytosquelette d'actine est manifestement modifié dans ces cellules. Le venin injecté par la guêpe pondreuse n'a aucun effet sur ce phénomène. *EH Richards et al.; Archives of Insect Biochemistry and Physiology 49 (FEB02) 108-124.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

57. On trouvera dans *CJ Lomer et al.; Annual Review of Entomology 46 (2001) 667-702*, une **revue** sur la **lutte antiacridienne**. Elle reconnaît que dans les situations d'urgence l'utilisation massive et coûteuse des insecticides est inévitable, mais que l'on peut envisager des mesures de lutte biologique pour limiter le nombre des situations d'urgence.

Les méthodes préventives sont recommandées, mais il faut bien réaliser que, quand il n'y a pas de danger en vue, personne ne veut s'en occuper car l'effet n'est pas mesurable pendant des années, on interrompt la veille et la prévention, etc... La revue insiste sur les formulations huileuses de *Metarhizium anisopliae* commercialisées en Afrique, en Australie et au Brésil. On arrive à tuer 70%-90% des criquets en 14-20 jours, ce qui suffit à éviter leur transformation en formes **migratrices**. On peut compléter avec la microsporidie *Nosema locustae* et des **hyménoptères parasitoïdes** des œufs comme les *Scelio*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

58. Le groupe de G Strobel décrit des antimicrobiens volatils émis par un champignon endophyte caractérisé l'an dernier, *Muscodor albus*, qui a été isolé dans la forêt humide d'Amérique centrale. Il s'agit donc d'un mycofumigation. Il colonise les rameaux de *Cinnamomum zeylanicum* (cannelle). La majorité de ces composés (alcools, esters, cétones, acides et lipides) a été caractérisée par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse puis des mélanges ont été essayés pour déceler leur toxicité. Aucun n'est létal individuellement, mais certains sont inhibiteurs pour des champignons et des bactéries. Une synergie notable est cependant décelable qui explique l'effet létal sur de nombreuses cibles. *GA Strobel et al.; Microbiology 147 (NOV01) 2943-2950.*

**AgraQuest** commercialise ce champignon à présent., comme un **substitut** du **bromure de méthyl** dont l'autorisation arrive à échéance. La firme préconise également son utilisation pour lutter contre la **maladie des vieux immeubles** qui est due à la colonisation de murs humides par des champignons qui causent des troubles divers aux habitants. *Industrial Bioprocessing 24 (FEB02) et AgraQuest Press Release (07JAN02).*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

60. Les *Bacillus thuringiensis* ne **supportent pas** bien le **rayonnement UV**, ce qui nuit à leur efficacité au champ. Un mutant **résistant** de *Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki*, produisant une **mélanine** protectrice a été isolé par des chercheurs israéliens. Il est plus efficace sur *Heliothis armigera* que la souche parentale. Il produit **seulement** la  $\delta$ -endotoxine **Cry1Ac**, et a perdu cry1Aa, cry2Aa et cry2Ab. *D Saxena et al.; Current Microbiology 44 (JAN02) 25-30.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

61. *Bacillus thuringiensis var. israelensis* produit une toxine active sur moustique, mais **est très instable dans le milieu**. L'*US Patent 6 335 008 (01JAN02)* de Michigan State University couvre l'expression de la  **$\delta$ -endotoxine** dans la **cyanobactérie** *Synechocystis 6803* qui facilite la persistance du biopesticide dans le milieu aqueux. Cette bactérie sert de nourriture naturelle des larves. On lui donne un avantage sélectif en lui faisant exprimer un gène de **résistance** au **bialaphos** que l'on pulvérise pour éliminer les autres cyanobactéries.

Mes archives indiquent que des projets anciens avaient été menés à bien dans ce domaine, l'un par Plant Genetic Systems, et l'autre par Ecogen en liaison avec l'University of Pennsylvania en début 1987.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

62. La production de **toxines protectrices** par des bactéries **endosymbiotiques** recombinantes est envisagée depuis longtemps (voir l'utilisation de *Clavibacter xylii* exprimant des  $\delta$ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis* par feu Crop Genetics International). *Enterobacter gergoviae* colonise l'intestin de *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm du coton). On vient de lui faire exprimer la toxine cytolytique **Cyt1A** de *Bacillus thuringiensis* active sur diptères, en guise de système modèle. *LV Kuzina et al., Current Microbiology 44 (JAN02) 1-4.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

63. On peut **limiter** la prolifération de *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* sur pommes et poires en les traitant par *Candida sake* ou *Pantoea* (alias *Enterobacter agglomerans*). Le mélange est le plus efficace, mais les deux populations poussent mieux à l'état séparé à 20°. En chambre froide (1°C) les populations sont stables et équilibrées durant les 30 premiers jours. Au delà *C.sake* domine. Aux deux températures la population maximale de *C.sake* est observée sur pommes et celle de *P.agglomerans* sur poires. *C Nunes et al.; Journal of Food Protection 65 (JAN02) 178-184.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

65. Un **densovirus** a été caractérisé chez le coccide des agrumes, *Planococcus citri*. Sa séquence indique qu'il est voisin du virus de *Periplaneta fuliginosa* (une blatte). *ML Thao et al.; Current Microbiology 43 (DEC01) 457-458.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

66. La toxine binaire de *Bacillus sphaericus 2297* a été exprimée dans *Enterobacter amnigenus*, une bactérie gram- isolée de l'intestin des larves du moustique *Anopheles dirus*. L'un des recombinants se révèle 20 fois plus actif sur les larves que *B.sphaericus 2297*. *P Khampang et al.; Current Microbiology 43 (DEC01) 448-451.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

## Les Productions animales

### La transformation des cellules animales

67. Les **vecteurs AAV** (Adeno-Associated Virus) sont basés sur ces petits virus défectifs dépendant, pour leur réplication, de virus accomplis comme les Adénovirus ou même certains virus herpétiques ou celui de la vaccine. La nature de la complémentation est inconnue mais on a des indices selon lesquelles elle est indirecte, le virus helper facilitant, d'une certaine façon; la réplication de l'AAV qui, sinon, ne se réplique qu'à bas niveau. Ils ont l'avantage de **permettre** une **transformation** de cellules **ne se divisant plus**, comme l'épithélium des voies aériennes, par exemple. Leurs **limitations** sont

essentiellement leur **faible capacité d'emport** (de l'ordre de 4,6 kb, dès qu'on dépasse cette capacité on observe une baisse rapide de l'efficacité d'encapsidation).

Ils s'insèrent avec une haute fréquence dans le génome de la cellule infectée en l'absence du helper et donnent lieu à une production massive en sa présence (voir le *Bulletin de Janvier* §82). Les AAV sont très peu regardants sur l'hôte et on les trouve partout. C'est le helper qui confère en réalité la spécificité de l'infection. L'intégration, par elle-même, du génome AAV ne confère **aucun signe pathologique**.

Le génome ADN des AAV est linéaire, monobrin, et comporte environ 4680 nucléotides. Les deux brins complémentaires peuvent être encapsidés, au hasard et avec une chance égale, par les trois protéines VP1, VP2 et VP3. Ils permettent une infection avec la même efficacité. Plasmides et phagemides contenant ces génomes permettent une production quand ils sont introduits dans une cellule exprimant un adénovirus.

Le sous-type AAV2 possède **deux répétitions terminales** inversées de 145-nucléotides (ITR), encadrant une région centrale de 4470 nucléotides avec deux gènes, rep et cap commandés par trois promoteurs potentiels p5, p19 et p40.

Les ITRs, qui adoptent une structure en épingle à cheveu, jouent plusieurs rôles au cours du cycle viral. Elles jouent d'abord le rôle d'**origine de réplication** et sont nécessaires à l'**excision** hors des plasmides procaryotiques. Elles sont également nécessaires à l'intégration dans le génome de la cellule hôte, comme pour l'emballage dans la capsid. La littérature donne à penser que ces ITRs ne jouent aucun rôle dans

### Le développement

68. Il règne une certaine confusion sur la **nature exacte** des **cellules "souches"** observées dans certains tissus **différenciés** (voir le *Bulletin de Décembre 2001* §68). Les cellules souches hématopoïétiques du muscle semblent bien être de nature hématopoïétique, exprimant les antigènes caractéristiques de ces cellules, Sca-1 et CD45 qui les distinguent des cellules myogéniques. Il n'y aurait **pas** de **transdifférenciation** (d'un tissu en un autre).

On doit donc se poser la question pour d'autres systèmes où une telle transdifférenciation a été annoncée. *SL McKinney-Freeman et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1341-1346.*

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗

69. Les **BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins) sont des **ligands** de la superfamille **TGFβ** qui participent aux échanges de messages entre cellules lors de l'individualisation des tissus. Ainsi les **activines** constituent un signal dorsalisant à long rayon d'action constituant un gradient. **BMP-2** et **BMP-4** induisent, inversement, une ventralisation de l'embryon, mais ne sont efficaces qu'au voisinage immédiat des cellules qui les produisent. On vient de montrer que le rayon d'action des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) est déterminé par le domaine basique N-terminal (trois acides aminés seulement pour **BMP-4**) entraînant une **restriction** de son expression à l'ectoderme non neural. Il est vraisemblable que les protéoglycanes à **héparane sulfate** (des protéines sur lesquelles sont greffés des glucosaminoglycanes sulfatés) piègent **BMP-4**. *B Ohkawara et al.; Current Biology 12 (05FEB02) 205-209.*

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗

70. On sait que, chez la Drosophile, **deux récepteurs** du peptide sécrété **Wnt** (Wingless (Wg) dans ce cas) existent, **Frizzled** (Fz) et **D-Frizzled2** (Fz2). En sus de la **transmission** du signal Wg, Fz

l'expression. On a donc tendance à incorporer des promoteurs hétérologues dans les vecteurs.

Elles sont donc indispensables dans les vecteurs, ne serait-ce que pour permettre l'excision après transfection dans les cellules productrices. Les fonctions rep et cap peuvent être fournies en trans par la cellule de production.

Pour augmenter la capacité d'emport (voir plus haut), on peut penser à supprimer le promoteur hétérologue. En effet une **certaine expression** est **possible** dans ces conditions.

**Targeted Genetics Corp.** vient de **breveter** une **modification** dans ce sens. *US Patent n°6 346 415 (12FEB02)*. On construit une ITR de 400 pb, donc un peu plus longue que celle d'origine, mais intégrant une séquence hétérologue activant la transcription améliorant de 2 à 5 fois la capacité transcriptionnelle des ITRs.

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗

(mais pas Fz2) transmet un **deuxième signal** non encore identifié, entraînant une **organisation planaire** des cellules. On vient de montrer que tous ces récepteurs perçoivent bien le signal Wg et ceci par leur extrémité N-terminale, mais seulement une fraction perçoit le signal polaire, et ceci est lié à des séquences tout le long de la protéine. *WR Strapps et al.; Development 128 (01DEC01) 4829-4835.*

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗

71. La **polarité dorso-ventrale** de la Drosophile est la conséquence d'une cascade localisée dans les régions ventrales. L'activation du **récepteur Toll** entraîne le **recrutement** de l'adaptateur **Tube** et de la protéine kinase **Pelle**. L'**inhibiteur** IκB-like **Cactus** est alors détruit et la protéine **Dorsal transférée** dans le **noyau**. On vient de montrer, par microscopie confocale, que Pelle **réprime** la relocalisation de **Tube**. L'inactivation du domaine kinase de Pelle, ou la suppression de l'interaction Tube/Pelle facilitent grandement le recrutement de Tube dans les membranes ventrales des cellules. L'autophosphorylation de Pelle, la phosphorylation de Tube et sa relocalisation permettent une régulation en retour dans la voie Toll avec recrutement puis inhibition du recrutement. *P Towb et al.; Development 128 (01DEC01) 4729-4736.*

⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗ ⊗

72. Les **muscles** des **membres** sont issus du dermomyotome situé latéralement dans l'embryon. Les cellules précurseurs doivent donc **migrer** vers leur position finale. Ce n'est qu'alors que le programme de différenciation est amorcé. Le **guidage** de ces déplacements est encore une **énigme**.

L'éphrine A5 et son récepteur A4 (EphA4) à tyrosine kinase sont exprimés dans ces cellules précurseurs et dans le mésoderme du membre. Il apparaît que l'éphrine A5 freine la migration des cellules exprimant EphA4 hors de l'ébauche du membre chez le poulet, les empêchant de s'égarer dans d'autres régions. *ME Swartz et al.; Development 128 (01DEC01) 4669-4680*

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

73. L'**involution** de la glande  **mammaire après la lactation** est le résultat d'une **apoptose** (mort programmée non inflammatoire).  **Progestérogène et glucocorticoïdes empêchent** cette **involution** en prévenant l'apoptose. Elles ont le **même effet** au cours de la lactation, maintenant la glande en état de production. *MN Berg et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 222-227.*

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

74. Le **collagène de type I** est la protéine animale la plus abondante. Il constitue les matrices osseuse, dermique et de bien d'autres tissus. On pourrait penser que, vu son rôle structural évident, cette protéine doit être particulièrement **stable, il n'en est rien**; la triple hélice du collagène "fond" au dessous de la température du corps, et elle est donc instable. Sa

**La Physiologie**

76. Une idée intéressante vient d'être brevetée dans l'*US Patent n°6 346 241 (12FEB02)*, dont je peux vous communiquer l'adresse du détenteur génial.. Le brevet part de l'idée que les **plantes** sont parfois toxiques et que l'on améliorerait l'ordinaire des herbivores en leur évitant ces substances. Il recommande donc de mélanger aux **aliments** pour bétail des **pneumatiques déchiquetés** qui adsorbent les toxines, ce qui permettrait d'utiliser le genévrier et les cèdres comme aliments par exemple. Il pense que, du coup, ces arbres qui envahissent les Etats-Unis le feront moins facilement. Cela devrait marcher pour les fougères Aigle en Bretagne.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

77. Le tube digestif des **porcelets** est **immature** au **sevrage** et ne produit que très peu d'enzymes digestives (amylases, invertases ou lipases). La digestion des fibres et de l'amidon peut être facilitée par l'addition d'enzymes aux aliments. On peut aussi faciliter cette digestion par chauffage qui gélatinise l'amidon, solubilise les fibres et les rend plus facilement digestibles. On a pu démontrer que les traitements thermiques améliorent effectivement les performances nutritionnelles des porcelets avec l'orge pendant les deux semaines suivant le sevrage, mais la **supplémentation en enzymes** n'a qu'un **effet limité**. *P Medela et al.; Animal Feed Science and Technology 95 (14JAN02) 113-122.*

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

78. **Ajinomoto** a breveté une **technique d'engraissement** des bovins aboutissant à une **viande plus persillée**. Elle consiste, évidemment, en une supplémentation de l'aliment du veau, avant que le rumen soit fonctionnel (pour éviter que cela ne profite qu'à la microflore du rumen), par des acides aminés (dont la firme est un gros producteur). *US Patent n°6,342,243 (29JAN02)* extension du brevet japonais 9-297977 du 16OCT97. A la façon dont les soins connexes sont décrits, cela doit être axé sur le bœuf de Kobé.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

configuration préférentielle est alors désordonnée et non pas hélicoïdale. Les collagènes des différentes espèces sont ajustés à la température du corps en dosant la densité des hydroxyprolines des hélices, de façon à les rendre intrinsèquement instables. Ainsi le collagène du poumon est instable à 37° et se dénature en quelques jours à cette température. Il ne se renature qu'au dessous de 30°. *E Leikina et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1314-1318.* C'est probablement une façon d'adapter la cohésion des tissus. Il ne faut donc pas dormir sur le sable chaud.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

75. Les **glucocorticoïdes** à fortes doses **stimulent** la **biogenèse** des **mitochondries**, mais **uniquement** dans les **muscles squelettiques**. *K Weber et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 177-184.*

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

79. La disponibilité de **gluten de maïs** (en gros ce qui reste après utilisation de l'huile de l'embryon et de l'amidon par l'industrie des amylicées) grandit du fait de la production croissante des sirops de glucose et fructose, et de celle de bioéthanol aux Etats-Unis. On l'utilise traditionnellement dans les aliments pour animaux du fait de sa richesse en protéines. On apporte également des phosphates qui sont, soit libres et utilisables, soit inclus dans l'acide phytique et peu utilisables par les monogastriques (porcs et poulets) et rejeté et polluant. Du coup des maïs dont la teneur en phytate est abaissée sont apparus sur le marché.

La disponibilité pour des poulets du phosphore dans les corn gluten feed de deux maïs, l'un conventionnel, et l'autre appauvri en phytates a été étudiée. Elle est effectivement deux fois supérieure dans les maïs "low-phytate". *CM Peter et al.; Animal Feed Science and Technology 95 (14JAN02) 63-71.*

Le **corn gluten feed** est un co-produit du wet milling (broyage humide nécessaire à la récupération de l'embryon et son huile). C'est un mélange des fibres du maïs, les liquides issus du trempage du grain (corn steep liquor sous forme concentrée) et les embryons déshuilés. Il est utilisable chez les ruminants ayant de gros besoins énergétiques du fait des contenus fermentescibles, mais son contenu énergétique pour les non ruminants est relativement bas, ce qui fait qu'il est utilisé quand le contenu énergétique n'est pas décisif, cas des poules pondeuses et des poulets en croissance. Les producteurs de maïs américains souhaitent élargir leurs débouchés, notamment vers le porc. Dans ce cas, la pollution par le phosphore phytique cause les problèmes bien connus des porcheries et de leurs effluents. Le relativement faible contenu énergétique et la présence de fibres peut être utile pour les truies en gestation où, comme c'est le cas pour le son de blé, il prévient un gain de poids non souhaité. Il est cependant peu utilisé aux Etats-Unis et la majorité (5 millions de tonnes par an) sont exportés notamment en Europe.

୧୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦ ୨୩୦

80. L'addition de la **bétaïne** dans les aliments pour certains poissons et crustacés améliore leurs qualités organoleptiques mais, surtout, rend cette nourriture plus appétente pour la plupart de ces animaux et favorise, de ce fait, leur croissance. Ceci est plus ou moins dû à son intervention dans l'utilisation des acides aminés soufrés, notamment la méthionine chez le **Tilapia**. L'aliment pour jeunes Tilapia (*Oreochromis niloticus* poisson d'eau douce élevé dans le monde entier, dont vous trouvez les excellent filets provenant le plus souvent d'élevage de Louisiane) contient usuellement 300 g protéines/kg (100 g provenant de la caséine et de gélatine, et 200 g d'un mélange d'acides aminés industriels). L'addition de seulement 1,5 g de bétaïne/kg d'aliments permet d'économiser la moitié de la choline nécessaire à la truite d'élevage. Il en est de même pour le Tilapia où un rapport choline/bétaïne de 1/10 est efficace.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

81. Dans le cadre du Pig Intestinal Molecular Microbiology Project, des chercheurs danois ont analysé la **flore intestinale** des **porcs** par des techniques **moléculaires** (sans cultures). *TD Leser et al.; Applied & Environmental Microbiology 68 (FEB02) 673-690*. Les auteurs utilisent, classiquement les ARNs ribosomiaux 16S. Il en ressort que 83% des échantillons ne correspondent à aucune séquence dans les banques de données (à 97% de similarité comme critère).

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

82. La **ghreline** est un ligand endogène du **récepteur sécrétagogue** de l'hormone de croissance, récemment isolé de l'estomac (mais qui est également présent dans l'hypothalamus), qui stimule l'appétit et le gain de poids. C'est manifestement une hormone importante de l'estomac couplant la sécrétion de l'hormone de croissance, de l'insuline et de la gastrine avec l'alimentation. *HM Lee et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 185-190*. Injectée dans les ventricules cérébraux, elle a effectivement un effet sur les neurones impliqués dans l'appétit, et son action est bloquée par une injection préalable d'un inhibiteur du **récepteur Y1** de **NPY** (neuropeptide Y). Seuls les neurones contenant de l'orexine, et non ceux contenant l'hormone concentrant la mélanine, sont ainsi activés. *CB Lawrence et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 155-162*.

On vient de constater une **expression** de la **ghreline** et de son **récepteur** dans les **testicules** durant toute la période post-natale et chez l'adulte pour le récepteur, notamment dans les cellules de Leydig. Or *C Gerald et al.; Nature 382 (11JUL96) 168-171* avaient cloné un **récepteur Y2** de **NPY** exprimé dans le cerveau et les testicules (pour quoi faire? avais-je noté dans le Bulletin de Septembre 1996). Comme la **leptine**, la ghreline intervient bien dans la **prise de nourriture**, mais également dans les **fonctions reproductrices**. *M Tena-Sempere et al.; Endocrinology 143 (FEB02) 717-125*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

83. Le **prolactin-releasing peptide** (PrRP) **inhibe** la **prise de nourriture** et le **gain de poids**. Si on compare son action à celle d'autres régulateurs comme la cholécystokinine, un régulateur homéostatique, et le chlorure de lithium, on constate qu'il agit centralement

comme les deux autres régulateurs le font périphériquement. Il ne cause pas l'aversion gustative causée par le LiCl, comme la **cholécystokinine**, mais il **active** les **signaux de satiété**. *CB Lawrence et al.; Endocrinology 143 (FEB02) 360-367*.

PrRP régule la cascade PI3K-protein kinase B/Akt comme l'insuline. PrRP et insuline stimulent **AKT** de façon rapide mais transitoire, et la wortmannine, inhibiteur de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), bloque l'activation d'AKT. PrRP et insuline activent la cascade PI3K-AKT indispensable à l'activation du promoteur de la prolactine via un mécanisme faisant intervenir CREB (cAMP Response Element Binding protein). *J Hayakawa et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 13-22*. Voir également le commentaire de *DL Duval et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 11-12*.

AKT (alias protein kinase B) est une sérine/thréonine kinase qui intervient également dans la stimulation du système immunitaire. Voir notamment le § 91.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

84. Les dérivés **11β-hydroxy** (11β-OH) de certains **stéroïdes** sont des **inhibiteurs** de l'isoforme 1 de la **11β-hydroxystéroïdes déshydrogénase** (11βHSD1) qui est exprimée dans les cellules de Leydig. L'enzyme intervient dans l'inhibition, par oxydation réversible, des glucocorticoïdes en métabolites **11-déhydro**. La 11β-hydroxylase est une enzyme de la corticosurrénale intervenant dans la **synthèse** des glucocorticoïdes, donnant les 11β-OH. On vient de montrer que cette enzyme est active dans les cellules de Leydig et doit intervenir dans la régulation de l'activité des glucocorticoïdes dans ces cellules, en produisant des **inhibiteurs endogènes** de 11βHSD1. *GM Wang et al.; Endocrinology 143 (FEB02) 621-626*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

85. **SF-1** (steroidogenic factor 1) est un **régulateur transcriptionnel** de gènes répondant au cAMP, mais on ne sait pas trop bien comment la **kinase PKA** cAMP-dépendante **module** les transcriptions dépendant de SF-1. Les gènes commandés interviennent dans la production de **stéroïdes** (d'où le nom) et donc dans la différenciation sexuelle. Son expression a été suivie dans le cadre d'une fusion avec la GFP (Green Fluorescent Protein). Si on co-exprime la sous-unité catalytique de PKA, la fluorescence (et donc la quantité de la chimère) sont notablement stimulées. L'expression du **messager** n'est cependant **pas augmentée**, et c'est la **stabilisation** de **SF-1** que l'on observe. *RAesoy et al.; Endocrinology 143 (JAN02) 295-303*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

86. L'**ovaire** est le seul site où **Nrip1** (Nuclear receptor interacting Protein 1/RIP140), un co-répresseur de récepteurs nucléaires, est **indispensable** à la **fertilité femelle**. Il est nécessaire à l'ovulation mais aussi, secondairement, à la gestation et à la parturition. Son expression a pourtant lieu en différents endroits du tractus génital. *G Leonardsson et al.; Endocrinology 143 (FEB02) 700-707*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

87. La **leptine** intervient dans le **métabolisme** des **lipides** et des **lipoprotéines hépatiques**. Une analyse des **profils de transcription** a été réalisée sur des souris *ob/ob* (dépourvues de leptine) et après traitement par l'hormone. Les souris *ob/ob* présentent une transcription très diminuée des gènes de **synthèse** des **acides biliaires** et leur **transport**, ainsi que de nombreux gènes de lipases ou impliqués dans la production des apolipoprotéines.

Cette dépression est **corrigée** par un **traitement** à la **leptine**. Ce dernier **réprime** les gènes impliqués dans la **synthèse** des **acides gras** et du **cholestérol**, la **glycolyse**, la **gluconéogenèse** et la **synthèse** de l'**urée**, mais **stimule** les gènes d'**oxydation** des **acides gras**, de la régénération de l'ATP, et les défenses antioxydantes.

### Le système immunitaire

89. Un article soulève un point intéressant, l'intervention de la **nutrition cellulaire** sur les **régulations** des **cellules T**. *G Angelini et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) (05FEB02) 1491-1496.*

Les **cellules T** ne **savent pas fabriquer** la **cystéine**, ni la prélever dans le milieu. Elle doit leur être fournie sous sa forme thiol réduite. Cystine et cystéine ne sont pas transportées par les mêmes systèmes. Or les cellules T ne savent **pas prélever** la forme **oxydée** **cys-S-S-cys (cystine)** du milieu extérieur oxydant, alors que dans leur cytosol réducteur, elle pourrait être réduite. Malheureusement pour elles l'essentiel de la cystéine du milieu est présente sous la forme oxydée. De plus les **lymphocytes** manquent de **cystathionase**, qui permettrait la production de cystéine à partir de la méthionine.

Macrophages et cellules présentatrices d'antigènes comme les cellule dendritiques leur fournissent cette cystéine, car elles savent prélever la cystine et elles réduisent la cystine intracellulairement. Ces cellules sécrètent, par ailleurs, de la **thioredoxine** qui est capable de réduire la cystine en cystéine hors de la cellule. Il y a donc une double aide, la **fourniture directe** et la **modification du statut redox** du milieu .

**Inversement** les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques **limitent** la **prolifération** des **cellules T** en les **privant de tryptophane**. Elles dégradent ce dernier grâce à l'**indoleamine 2,3-dioxygénase** intracellulaire. Les macrophages, dont la maturation est induite par le facteur M-CSF, empêchent la maturation des cellules T en produisant l'enzyme, après un **échange de signaux** avec les cellules T. Il semble que ce soit un des éléments de l'immunotolérance de l'embryon chez les mammifères. On peut se rappeler l'utilisation de la L-asparaginase pour lutter contre les leucémies lymphoblastiques aiguës, on pensait qu les cellules tumorales en avaient besoin. Il est maintenant probable que c'est le système immunitaire que l'on stimulait.

Tout indique un basculement de l'utilisation de l'énergie du glucose vers celle des acides gras. L'utilisation aérobie entraîne un stress oxydatif, ce qui explique la stimulation des défenses correspondantes. Les **cinétiques d'induction** ou de répression permettent de dégager des groupes de gènes plus ou moins co-régulés. Dans le cas de l'oxydation des acides gras la régulation de cette synchronie passe par la production du régulateur commun PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$ ).

Dans le cas des HDL (High Density Lipoprotein) et les sels biliaires, la situation est plus complexe, et on doit avoir intervention de facteurs encore inconnus. *CP Liang et al.; Journal of Biological Chemistry 276 (28DEC01) 49066-49076.* La **leptine régule directement** l'expression de l'**hormone de croissance** et la production d'**oxyde nitrique** dans l'**hypophyse** du **porc**. *M Baratta et al.; Endocrinology 143 (FEB02) 551-557.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

90. On trouvera dans *PA Sieling et al.; Current Opinion in Microbiology 5 (FEB02) 70–75*, une revue sur les **récepteurs Toll-like** des mammifères (voir le *Bulletin de Février §73, Novembre 2001 §62*). Découverts en 1997, les récepteurs Toll-like, présents à la surface des macrophages et des cellules dendritiques, ainsi que de cellules des voies d'entrée vraisemblable des pathogènes fonctionnent différemment chez les insectes et les mammifères, mais concourent au même but. Ils interviennent dans l'**immunité innée**, **sans** intervention d'un **apprentissage**. Ils **détectent** des **catégories** et des **patrons**, mais pas des individualités moléculaires. Ils échantillonnent la flore microbienne et déclenchent des réponses globales adaptées, en déclenchant les voies de l'**IRAK** (Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase (IRAK) ou **NF-kB**.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

93. **CD40** est un récepteur de la famille TNFRs (**Tumor Necrosis Factor Receptors**) qui comprend également CD27, CD30, OX40, RANK, LT- $\beta$ R, Fas, ainsi que les TNFR-1 et -2, dont le ligand est dénommé, avec simplicité, **CD40L**.

La **stimulation de CD40 active les cellules B**, dont elle assure la survie et la prolifération, ainsi que plusieurs aspects des réponses humorales (anticorps circulants) dépendant des cellules T. **CD40 active**, à son tour, les voies **JNK/SAPK** et **NF-kB**. Toutes deux impliquent des **sérine/thréonine kinases** qui régulent l'expression d'une série de gènes par **activation** des facteurs de transcription **AP1** et **Rel**, respectivement.

**CD40 active**, par ailleurs, la voie de la **kinase p38** qui fait intervenir la **phosphorylation** de **facteurs de transcription** comme **ATF2**. Il peut également activer au moins une voie faisant intervenir des tyrosine kinases. C'est notamment le cas de la **PI-3 kinase** (PI-3K) qui phosphoryle les phospholipides membranaires.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

La multiplicité des voies gouvernées par ce récepteur joue également dans les cellules B et il active des voies gouvernant l'expression de très nombreux gènes exprimés dans ces cellules. La spécificité ou non des ces activations reste à déterminer.

Une analyse des **profils d'expression des cellules B** sous l'action de **CD40L** a été entreprise avec l'aide d'Affymetrix. *H Dadgostar et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99 (05FEB02) 1497-1502.*

On constate qu'en sus des gènes connus impliqués dans le maintien, la maturation et la prolifération des cellules B, également induits par des mitogènes comme les lipopolysaccharides, on trouve des gènes intervenant dans la formation des centres germinatifs, la synthèse de cofacteurs de cellules T facilitant l'immunité humorale dépendant des cellules T. Ce qui encore plus intéressant, les activations par chacune des voies a pu être éclaircie, et on peut déterminer celles qui ont des débouchés **indépendants** ou **convergen**ts. Les répression sont également visibles. La voie p38 est importante dans ce sens tandis que NF-kB intervient surtout dans les activations.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

93. On sait que les **récepteurs membranaires activés** recrutent souvent des **co-facteurs** qui se rassemblent en complexes souvent imposants. On vient de montrer que la **sphingomyélinase acide est indispensable au regroupement** du complexe **CD40**. La stimulation des lymphocytes via CD40 entraîne le passage de la sphingomyélinase de réserves intracellulaires vers les radeaux lipidiques membranaires. Elle amorce, alors, la libération dans le milieu de céramides qui, à leur tour, provoquent le regroupement des CD40 dans ces domaines riches en

**Les Vaccins**

98. Les **mannanes couplés oxydativement aux antigènes** protéiques constituent des **adjuvants** valables pour des **vaccinations mucosales**. On manque de tels adjuvants car l'alun couramment utilisé ne suscite pas d'immunité mucosale (voir le *Bulletin de Novembre 2001 §67*), et seule la toxine cholérique est largement utilisée. Il induit l'apparition d'IgA, IgG1 et IgG2a dans le sérum, d'IgA localement dans le poumon, mais aussi dans diverses sécrétions. Le couplage est indispensable. *J Stambas et al.; Vaccine 20 (15JAN02) 1068-1078.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

99. Pour l'instant le vaccin utilisé ou préparé en cas d'urgence contre la **fièvre aphteuse** est un vaccin **inactivé** par l'éthylèneimine associé à un adjuvant, qui présente toujours des risque dans l'inactivation où de dissémination avant inactivation du virus préparé en grandes quantités. Il faut donc disposer d'installations de sécurité coûteuses. De très nombreuses tentatives de tourner cette difficulté ont eu lieu. Des chercheurs du Plum Island Animal Disease Center cherchent à améliorer un vaccin viral recombinant contre la fièvre aphteuse basé sur un **vecteur adénovirus 5 humain** exprimant des antigènes du virus de la fièvre aphteuse. Pour l'instant il faut deux infections

sphingolipides. Des déficiences de l'enzyme, la neutralisation des molécules en surface, la dislocation des radeaux lipidiques empêchent le regroupement des CD40 nécessaire à l'activation des cellules. *H Grassme et al.; Journal of Immunology 168 (01JAN02) 298-307.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

94. **STAT6** (pour (Signal Transduction and Activator of Transcription) joue un rôle important dans l'**activation** et la **différenciation des cellules B** sous l'action d'**IL-4** (interleukine-4). On a essayé d'identifier les cibles de STAT6 grâce à des **profils d'expression** après son action sur des cellules B de souris STAT6<sup>+/+</sup> ou STAT6<sup>-/-</sup>. On peut détecter des modifications de l'expression d'une centaine de gènes dont 70 connus. On peut noter, parmi eux, les gènes de facteurs de transcription (dont Krox20), kinases, des enzymes, des récepteurs de surface et les chaînes d'immunoglobulines. On a autant de gènes réprimés que de stimulés sous l'action de STAT6. *AJ Schroder et al.; Journal of Immunology 168 (01FEB02) 996-1000.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

96. L'expression de **CD40** à la surface des cellules **dendritiques** (DCs) est nécessaire à la **différenciation** des cellules **Th2**, mais **pas des Th1**. Des DCs confrontées par exemple à un antigène du parasite *Schistosoma mansoni* élicitent une réponse des Th2, elle ne le font pas chez des souris CD40<sup>-/-</sup>. Une stimulation par un antigène de *Propionibacterium acnes* entraîne une réponse Th1 et n'est pas affectée chez ces souris. *AS MacDonald et al.; Journal of Immunology 168 (15JAN02) 537-540.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

successives pour obtenir une réponse correcte avec les séquences codant la protéine de capsid P1 et la protéase 3C. Ils viennent de montrer que l'expression de la **région P1** du génome de la souche A24 (celle qui est prévalente actuellement en Argentine, Uruguay et sud du Brésil) donne une bonne réponse en **une seule infection** chez le **porc**. Il vaut mieux commencer à immuniser les porcs, car un seul porc dissémine le virus autant que 3000 vaches. *MP Moraes et al.; Vaccine 20 (22FEB02) 1631-1639.*

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

100. La **cowdriose** (causée par *Cowdria ruminantium*) affecte les petits ruminants dans toute l'Afrique sub-saharienne ainsi que dans la Caraïbe avec une mortalité qui peut atteindre 90% chez les races sensibles. Son vecteur est la tique *Amblyomma*. Une **vaccination** contre la **cowdriose** (causée par *Cowdria ruminantium* souche Crystal Springs) associant un **immunisation** par **ADN**, suivie par un **rappel protéique** utilisant la protéine immunodominante MAP1 (major antigenic protein 1) est décrite par des chercheurs de Floride dans *A Nyika et al.; Vaccine 20 (15JAN02) 1215-1225*. On a surtout une plus forte réponse des cellules **Th1** et une production d'**IgG2a**.

Des souris DBA/2 immunisées avec la seule protéine ne produisent qu'une réponse Th2 non protectrice (caractérisée par les IL-4, IL-5, IL-10 ainsi que d'IgG1s. Un vaccin utilisant la Map1 de la souche voisine Ndizi ne donne pas lieu à une bonne protection croisée.

Il existe un vaccin inactivé qui est actuellement essayé au Zimbabwe, en Afrique du Sud, au Botswana et en Zambie. Il donne une protection croisée.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

101. Des chercheurs brésiliens et de l'INRA à Jouy ont exprimé l'antigène L7/L12 ribosomal de *Brucella abortus* chez *Lactococcus lactis*. Voir le Bulletin de Février §75). La souche RB51 sert de vaccin pour le bétail aux Etats-Unis. Elle dérive de la souche virulente 2308 et elle n'est pas recommandée pour les femelles gestantes. Il n'existe, par ailleurs, aucun vaccin humain.

On cherche donc à utiliser des vaccins recombinants plus commodes, notamment pour identifier les vaccinations et éviter les réversions toujours possible avec des souches atténuées.

Il faut cependant une immunité cellulaire pour assurer une bonne efficacité au vaccin. C'est un premier pas vers un **vaccin oral**. C'est la voie normale d'entrée de *Brucella* et il faut donc susciter une immunité **mucosale**. Le gène a été exprimé sous la commande d'un promoteur sensible à la nisine. L'antigène a été ciblé vers différentes structures du *Lactococcus*.

### Les Pathogènes

103. La toxine du **charbon** comprend trois protéines différentes : **antigène protecteur**, **facteur œdémateux** et **facteur léthal**. L'antigène protecteur (PA) s'associe, soit au facteur œdémateux, soit au facteur léthal. PA permet la **fixation** de la **toxine** sur le **récepteur** de la **cellule cible** et facilite, après protéolyse, la **translocation** des facteurs œdémateux et léthal par un processus dépendant du pH. PA63, provenant de la protéolyse assure cette translocation. PA63 constitue, dans des bicouches lipidiques, un canal sélectif pour les cations possédant un diamètre  $\geq 12\text{\AA}$ . Ces pores ont une forme de champignon heptamérique avec un canal transmembranaire de  $\beta$ -barillets. *S Nassi et al.; Biochemistry 41 (05FEB02) 1445-1450.*

Le même groupe de Harvard a analysé la formation des heptamères et surtout les sites de fixation des deux autres facteurs. L'heptamère PA en solution fixe **trois molécules** du ligand (facteur œdémateux ou facteur léthal) ce qui signifie que **chaque ligand** oblitère des sites sur **deux sous-unités PA**, laissant un seul monomère libre, ce qui crée une asymétrie. *J Mogridge et al.; Biochemistry 41 (22JAN02) 1079-1082.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

Une production cytoplasmique reste faible, un ciblage vers la sécrétion la multiplie par six avec une efficacité de sécrétion de 35%, une fusion avec la nucléase de staphylocoque par 16. L'utilisation du **stimulateur de sécrétion** LEISSTCDA, mis au point par le même groupe, aboutit au même résultat avec une efficacité de sécrétion de 50%. *LA Ribeiro et al.; Applied & Environmental Microbiology 68 (FEB02) 910-916.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

102. Comme on pouvait s'y attendre, la floraison des publications sur les **vaccins** contre le **charbon** est printanière. Une vaccination **actuelle** efficace consiste en **six injections sous-cutanées** du vaccin AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed, sur alun, autorisé en 1970 aux Etats-Unis ) sur 18 mois, à renouveler ensuite annuellement!!!. On sait depuis 1990 que les femmes réagissent, par ailleurs, mal à ces injections (?) . On tient donc à diminuer le nombre des injections, ne serait-ce que pour **alléger le dispositif** en cas de **vaccinations de masse**. Les chercheurs militaires américains et la firme BioPort cherchent surtout à passer de trois injections à deux pour les premières 4 semaines. Ils préconisent une injection intramusculaire comme pour tous les autres vaccins commercialisés actuellement. Cela ne modifie pas la réponse immunitaire, mais diminue les réactions cutanées. Une campagne massive de vérification est en cours au Centers for Disease Control and Prevention pour confirmer ces résultats. *PR Pittman et al.; Vaccine 20 (31JAN02) 1412-1420.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

104. L'**inactivation** du gène codant la protéine du **prion** n'est pas fatale, car les souris chez qui une délétion partielle a été pratiquée vivent normalement, mais sont résistantes à l'encéphalite spongiforme.

Le groupe de Collinge a utilisé le système Cre-lox pour déclencher à volonté cette excision et examiner les effets. L'ablation à 9 semaines ne cause aucune difficulté jusqu'à 15 semaines.

On observe, cependant, une **modification** de l'**excitabilité** des neurones CA1. *GR Malluci et al.; The EMBO Journal 21 (01FEB02) 202-210.*

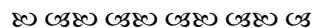
☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

105. Les **cellules dendritiques** (présentatrices d'antigènes dans le système immunitaire) sont des **réservoirs** de **mycobactéries**. *X Jiao et al.; Journal of Immunology 168 (01FEB02) 1294-1301.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

106. Le **morphotype SmO** (Smooth Opaque) de *Mycobacterium avium* est avirulent, alors que le **SmT** (Smooth Transparent) est virulent. Les trois voies de MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) sont également activées dans les **macrophages**, alors que **seul** le morphotype **SmT est infectieux** dans ces cellules. L'inhibition des voies ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) ou p38(MAPK) entraîne cependant des conséquences différentes entre les deux morphotypes. L'inhibition de la voie p38 déprime la multiplication de SmT avec une réduction parallèle de

la prostaglandine E2. L'inhibition de la cyclooxygénase 2 inhibe également la prolifération de SmT, ce qui confirme le rôle de la prostaglandine E2 dans la stimulation. L'induction de la voie ERK par SmO est accentuée par rapport à SmT, et son inhibition entraîne une baisse de la production TNF- $\alpha$  et une prolifération accrue de SmO. *HM Tse et al.; Journal of Immunology 168 (15JAN02) 825-833*. Ce sont ces voies de signalisation qui font la différence entre la pathogénicité de ces deux souches.



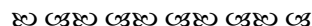
### Les animaux transgéniques

108. Les **cellules stromales** de la **moelle osseuse** sont **multipotentes** et capables de se différencier *in vivo* dans toutes sortes de contextes mésenchymateux. La transplantation de cellules bovines dans des fœtus porcins permet leur incorporation dans les **muscles squelettiques**. *PL Martin et al.; Animal Biotechnology 12 (NOV01) 183-191*.



109. Une publication décrit l'obtention de **porcs transgéniques** exprimant la **GFP** (protéine fluorescente verte) à la suite d'un transfert d'un noyau de fibroblastes transformés dans ce sens. *KW Park et al.; Animal Biotechnology 12 (NOV01) 173-181*.

Les porcelets sont à **peu près normaux**, mis à part le **syndrome classique** se traduisant par une **taille anormalement forte** du fœtus. Le même groupe de l'University of Missouri-Columbia décrit la production de porcs à partir d'**ovocytes maturés in-vitro** et transformés par un **vecteur rétroviral** porteur de la même GFP. *RA Cabot et al.; p. 205-214*.

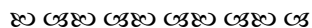


## Les Productions Microbiennes

110. **###** L'**étendue** et l'**importance** des **transfert latéraux (horizontaux)** de gènes chez les microbes sont discutées dans la **revue** de *MA Ragan; Current Opinion in Genetics & Development 11 (DEC01) 620-626*.

Ces transferts ont quitté l'aire des mécanismes exotiques pour être maintenant considérés comme aussi importants que la **transmission verticale** (celle par division cellulaire). C'est probablement la source de loin la plus efficace d'acquisition de **nouvelles compétences** pour la cellule, en évitant d'avoir à construire *de novo* un appareil métabolique compliqué.

La revue discute **quatre méthodes** utilisées pour **détecter** les produits de tels **transferts**. La **première** consiste à analyser la distribution des gènes et des phénotypes. La **seconde** est la recherche de **compositions atypiques de l'ADN** (G+C; etc...). La **troisième** est l'observation des **différences de contenus en gènes**. La quatrième est la révélation de **discordances** dans les **arbres phylogénétiques**.

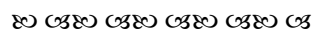


111. Les **promoteurs bactériens** contiennent souvent de **nombreuses séquences régulatrices**, notamment pour les opérons ayant des fonctions pleiotropes. Ceci permet de moduler l'expression des opérons en fonctions d'indications multiples. C'est donc un élément de **flexibilité**.

C'est le cas des opérons des ARNs ribosomiques qui sont commandés par deux promoteurs, l'un, actif en permanence, assure la fourniture de base, tandis qu'un

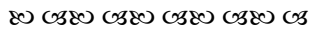
autre est activé lors d'une croissance active de la population, pour subvenir aux besoins croissants. La disposition en tandem permet par ailleurs des interactions plus faciles, notamment dans le cas de promoteurs divergents.

**FIS** est un **régulateur** couplant le métabolisme avec la topologie de l'ADN lors d'une croissance rapide. La transcription de **fis** croît brutalement lors du **passage** de la phase **stationnaire** à la phase de **croissance**, puis **décroît** aussi brutalement au milieu de la phase **exponentielle**. Il existe un promoteur divergent, appelé **div** de ce fait, qui ne commande apparemment aucun gène et qui est localisé immédiatement en amont du promoteur de **fis**. Il **interfère** directement avec le **fonctionnement** du promoteur **conventionnel** de **fis**, mais on ne savait pas bien comment. On vient de montrer qu'il existe **au moins deux promoteurs additionnels** en tandem, **P2** et **P3**, fonctionnant dans la direction de **fis** et répondant à des conditions de transcription sub-optimales. **div** et les autres promoteurs travaillent de façon coordonnée (**P2** et **div** sont d'ailleurs recouvrants) et sont modulés les uns par rapport aux autres par un seul facteur de transcription, **IHF**.



112. Des chercheurs de Wien veulent **limiter** le **nombre de copies** de plasmides pour éviter une **surcharge métabolique** dans des cellules recombinantes, ce qui nuit à la production de protéines hétérologues.

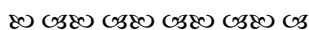
En supprimant l'homologie entre les RNA I/RNA II de ColE1 on peut piloter le nombre de copies. *R Grabherr et al.; Biotechnology & Bioengineering 77 (20JAN02) 142-147.* ColE1 est effectivement un plasmide à grand nombre de copies. Un transcrite du plasmide, ARN-II, s'hybride en permanence avec l'ADN du plasmide au voisinage de l'origine de réplication où il est clivé par la Rnase H pour donner l'amorce de réplication. Un autre ARN appelé **ARN-I neutralise l'ARN-II** en le capturant par **hybridation**. Cette capture est, d'ailleurs, renforcée par une protéine de 63 aa. appelée Rom codée par le plasmide. On a, par là, une limitation du nombre de copies et un contrôle de l'incompatibilité.



113. ### Les protéines **Amt** sont des transporteurs d'ammonium conservés chez les bactéries, les archées et les eukaryotes (c'est le support du système rhésus chez l'homme). Chez les **bactéries** et les **archées**, le gène codant le transporteur est invariablement associé dans un opéron (série de gènes co-régulés), où il est toujours associé au gène **glnK**, qui code un membre de la famille de protéines transductrices de signaux PII intervenant dans la régulation du métabolisme de l'azote. Voir le *Bulletin de Février §101.*

On vient de montrer que chez *Escherichia coli* et *Azotobacter vinelandii*, **GlnK** se fixe dans la membrane grâce à **AmtB** et que GlnK est un régulateur négatif de l'activité de transport d'AmtB. Cette fixation dépend de l'état d'uridylylation de GlnK qui est modulé selon le statut de l'azote cellulaire, elle dépend de la partie C-terminale d'AmtB, celle qui est de longueur variable.

Cette situation est intéressante car elle permet l'ajustement d'un système de transport transmembranaire selon la concentration extracellulaire de l'ammonium et celle du statut intracellulaire de l'azote. *G Coutts et al.; The EMBO Journal 21 (15FEB02) 536-545.*



114. Lorsqu'un organisme **oxyde un substrat**, il doit éliminer les électrons correspondants et usuellement il le fait sur l'oxygène ou sur un autre accepteur inorganique (respiration), ou sur une partie du substrat lui-même (fermentation). On peut les lui subtiliser et créer ainsi un courant électrique entre la bactérie et une électrode. On a, alors, construit une **pile à combustible**. On a tenté l'opération avec *Desulfovibrio desulfuricans*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas species* ainsi qu'avec des **enzymes redox**.

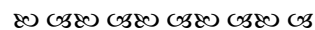
On cherche à exploiter ce mécanisme pour créer des générateurs biologiques d'électricité, mais ils ne fonctionnent pas bien car ce n'est pas l'intérêt de la cellule sauf dans quelques cas comme la respiration sur fer. En fait de nombreuses protéines redox sont actives électrochimiquement **dans** la cellule, mais le transfert des électrons de la protéine à l'électrode est inhibé par le voisinage peptidique du site actif et, de plus, les protéines sont englobées dans un contexte pariétal insuffisamment conducteur. On tourne cette difficulté en utilisant ce que l'on appelle des

médiateurs jouant le rôle de navettes à électrons, comme le **rouge neutre**, la **thionine**, le **méthyl viologène** ou la **2-hydroxy-1,4-naphtoquinone** qui permettent le transfert des électrons de la cellule vers une électrode sans trop se les faire pirater en cours de route. Mais leur gestion difficile a empêché toute utilisation commerciale.

Le transfert direct est tentant. La compréhension du phénomène dérive de l'étude de bactéries réduisant le fer ferrique dans le cas de cette respiration particulière. Comme cette version du fer est totalement insoluble à pH neutre, il faut bien que les électrons lui soient directement transférés et, effectivement, des bactéries comme *Shewanella putrefaciens* et *Geobacter metallireducens* adhèrent étroitement aux particules de fer ferrique. De plus, **80%** de leurs quatre **cytochromes membranaires** sont localisés dans la **membrane externe en anaérobiose**.

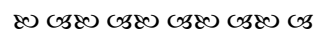
Des chercheurs coréens ont monté une pile de ce type, sans aucun médiateur ajouté, avec des souches de *Shewanella putrefaciens*. Ils ont inhibé le transfert des électrons au fer par mutation. Cela fonctionne uniquement en anaérobiose, et pas en aérobie ni chez *E.coli* que ce soit en aérobie ou anaérobiose. Travaillant à fortes densités cellulaires (0,47 g de matière sèche par litre) et une électrode à grande surface ils ont obtenu un rendement coulombique (la proportion des électrons transférés) de plus de 3 sur 12 heures. *HJ Kim et al.; Enzyme and Microbial Technology 30 (FEB02) 145-152.*

L'University of Massachusetts Amherst et le Naval Research Laboratory sont en train d'expérimenter une cellule de ce type utilisant les microorganismes d'une vase réductrice riche en matière organique avec une anode dans la boue et la cathode dans l'eau au dessus. Des *Geobacter* du type *metallireducens* s'agrègent autour de l'anode qu'elles utilisent pour y déverser leurs électrons; comme dans le système précédent. Je n'ai pas réussi à me procurer l'article annoncé dans Nature.



115. La majorité des **phéromones de densité cellulaire (quorum sensing)** des bactéries Gram<sup>-</sup> sont des **acyl L-homosérine lactones**. L'autoinducteur **AI** (3-hydroxybutanoyl)-L-homosérine lactone) de *Vibrio harveyi* en fait partie. Mais elle utilise également AI-2 (AutoInducer-2) qui intervient, en conjonction avec la première, pour déclencher la luminescence (voir le *Bulletin de Novembre 2001 §86*) et dont la structure chimique était inconnue.

*X Chen et al. Nature 415 (31JAN02) 545-549* viennent de révéler par hasard cette structure d'AI-2, car ils l'ont isolé en même temps que son récepteur LuxP dont ils caractérisaient la structure cristalline. Or c'est une molécule intéressante, car c'est un **furanosyl borate diester**. Le rôle du bore dans la cellule n'est pas un fait couramment admis.



117. La **FK506 binding protein** (FKBP) fait partie des **peptidyl-prolyl cis-trans isomérases** (PPIase) qui facilitent l'isomérisation de la liaison imide de la proline dans les polypeptides. Cette **isomérisation** est un **facteur limitant** de l'**acquisition** de la **conformation définitive** des protéines. Il en existe deux sous-groupes distincts par la taille 16-18 kDa et 26-33 kDa (16-18 kDa et 26-33 kDa plus longue de 100 acides aminés à l'extrémité C-terminale). Les versions courtes auraient également une fonction de chaperones. Il n'en existe qu'une seule chez l'archée *Pyrococcus horikoshii* (longue, de 29kDa, comme c'est le cas pour *Archaeoglobus fulgidus* ou *Aeropyrum pernix*). Elle est **utilisable** chez *Escherichia coli* pour **éviter l'agrégation** des protéines hétérologues. *A Ideno et al.; Applied & Environmental Microbiology* 68 (FEB02) 464-469.

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

118. La **production du p-hydroxybenzoate** (utilisé pour fabriquer les polymères des cristaux liquides, par carboxylation du phénol) consomme beaucoup d'énergie et engendrent beaucoup d'effluents. La production microbienne avec un *Pseudomonas putida* **recombinant** en partant du toluène est décrite *ES Miller et al.; Biotechnology & Bioengineering* 77 (FEB02) 340-351 par des chercheurs de DuPont.

Le *Pseudomonas* est cultivé sur **glutamate**, avec induction des gènes *tmoABCDE* (toluène 4-monoxygénase qui convertit le toluène en p-crésol) par le salicylate et des gènes *pchCF* et *phbz* (conversion du p-crésol en p-hydroxybenzaldéhyde, puis p-hydroxybenzoate) par l'IPTG. Le toluène est fourni par voie gazeuse. La monoxygénase est relativement stable (demi-vie de 28 heures).

Une mutation ponctuelle a été réalisée dans le gène de la p-hydroxybenzoate hydroxylase, ce qui évite une hydroxylation en protocatéchuete. Mais la production sur glutamate est-elle réellement intéressante?

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

119. L'industrie des microalgues est en pleins remaniements financiers et technologiques (voir le *Bulletin de Février* §137). **Aquasearch** a abandonné ses photobioréacteurs et cesse momentanément (???) ses opérations industrielles.

**Cyanotech** a développé, comme sa concurrente, l'astaxanthine pour l'aquaculture, mais aussi comme antioxydant pour usages humains et affirme que le marché s'étouffe. Elle utilise 8 hectares de bassins libérés par l'abandon de la culture de spirulines (*Bulletin de Janvier* §149). *Industrial Bioprocessing* 24 (FEB02).

**Martek Biosciences** (voir le *Bulletin de Février* §146) a levé \$22 millions qui vont lui permettre d'agrandir ses installations de production de microalgues destinées à la production d'acides gras polyinsaturés pour l'alimentation. La société utilise une production dans des fermenteurs conventionnels qui n'utilisent pas la photosynthèse mais du glucose. La firme utilise *Cryptocodinium cohnii* (voir le *Bulletin d'Octobre 2001* §206) qui est une dinophycée hétérotrophe obligatoire et qui accepte donc de vivre dans ces conditions (voir l'*US Patent n°5 492 938* (20FEB96) pour ceux que cela intéresse) et un *Phaeodactylum tricornutum* recombinant (voir le

*Bulletin de Juillet 2001* §123 ou *LA Zaslavskaja et al.; Science* 292 (15JUN01) 2073-2075).

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

120. Produire des **polyhydroxycanoates** dans les plantes est possible, mais la **variété** des polymères obtenues à partir de **bactéries** n'y a pas été encore égalée. C'est pourquoi Metabolix, qui a repris le portefeuille de Monsanto dans le domaine de la production des polyhydroxycanoates, s'intéresse beaucoup aux productions microbiennes et a obtenu l'*US Patent 6 329 183 (11DEC01)* sur l'utilisation des polyols, comme glycérol, 1,2-propanediol et 1,3-propanediol pour cette production. Glycérol et 1,2-propane diol sont des substrats largement disponibles et pas trop coûteux. Le brevet couvre l'utilisation de glycerol déshydrogénase, diol déshydrogénase, acyl-CoA transférase, acyl-CoA synthétase,  $\beta$ -cétotiolase, acétoacétyl-CoA réductase, PHA synthase, glycérol-3-phosphate déshydrogénase et glycérol-3-phosphatase exprimées dans des **bactéries recombinantes**, chez qui certaines sont déjà présentes. Le brevet est clairement rédigé et les exemples illustrent bien la démarche utilisée.

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

121. **CreA** est un régulateur de la répression catabolique chez *Aspergillus nidulans*. Cette répression est un mécanisme favorisant l'utilisation du glucose aux dépens des autres sucres disponibles, ne permettant leur utilisation que si le glucose est absent. Son intervention sur l'expression d'une  $\alpha$ -amylase a été étudiée. *T Agger et al.; Journal of Biotechnology* 92 (18JAN02) 279-285.

La **surexpression** du gène *creA* entraîne une croissance spécifique plus faible, et une certaine répression de la synthèse de l' $\alpha$ -amylase à fortes concentrations de glucose. Sa neutralisation entraîne une croissance spécifique plus faible mais, par contre, la **production de l' $\alpha$ -amylase** est complètement **dérégulée** en présence de **glucose**. L'amidon étant un bon inducteur, on observe une meilleure utilisation de l'amidon avec une meilleure hydrolyse, et une absence de répression par le glucose.

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

122. Les **sophorose-lipides** sont des **surfactants** intéressants, et sont produits en grandes quantités par certaines levures. Une production par *Candida bombicola* est décrite dans *V Guilmanov et al.; Biotechnology & Bioengineering* 77 (05MAR02) 489-494. Les **transferts d'oxygène** sont **critiques**, aussi bien pour la productivité volumétrique que pour la production globale. Ils interfèrent également avec la nature des lipides incorporés. A **faible oxygénation**, on obtient surtout des acides gras **saturés**, à plus **forte oxygénation**, on a des **insaturés**.

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

123. Des chercheurs de Pharmacia indiquent que l'**accumulation de formate** dans les cultures en fed-batch d'*Escherichia coli* normales ou recombinantes est due au **catabolisme** de l'**ADN libre**. *A Castan et al.; Biotechnology & Bioengineering* 77 (05FEB02) 324-348.

⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘ ⌘

124. J'ai évoqué dans le *Bulletin de Février* §107, les système à partition entre deux phases aqueuses.

Une **revue plus générale** sur les systèmes de partition est parue dans *JJ Malinowski; Biotechnology Advances 19 (NOV01) 525–538*. Elle laisse de côté le sujet traité le mois dernier des systèmes à deux phases aqueuses. Elle envisage, en effet, les systèmes à deux phases dont une est **organique**, la population microbienne opérant dans la phase aqueuse. Elle insiste sur le choix du solvant organique dans les applications industrielles, et sur le couplage entre fermentation et **soustraction** du **produit**, ou le **transfert régulé** du **substrat** de ou vers la phase

aqueuse à partir de la phase organique. La non-biodégradabilité de la phase organique est à prendre en compte, car ce sont surtout des bioréacteurs à cellules, et non enzymatiques, qui sont envisagés;

On peut alors utiliser un substrat **toxique**, et cela a été réalisé avec du phénol ou le pentachlorophénol, en limitant les concentrations auxquelles le microorganisme est confronté des niveaux sub-inhibiteurs.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

## Les Protéines et les Enzymes

125. La **production de peroxyde d'hydrogène** par de la **glucose oxydase immobilisée** sur alumine et verre (opération faisant suite à celle décrite dans le Bulletin de Février §109) est décrite dans *T Tzanov et al.; Journal of Biotechnology 93 (31JAN02) 87-94*. Elle est destinée au blanchiment des textiles.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

126. L'impact de divers **solvants** sur la **stabilisation thermique** et vis à vis de **solvants** de la  **$\beta$ -galactosidase** a été étudiée après immobilisation sur un gel thiolsulfinate-agarose. *G Irazoqui et al.; Biotechnology & Bioengineering 77 (15FEB02) 430-434*.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

127. Des chercheurs autrichiens décrivent, dans le cadre d'un travail continu sur le sujet, un procédé de **production de galacto-oligosaccharides** à haute température (70°), grâce à des  $\beta$ -glycosidases de *Sulfolobus solfataricus* (SsbetaGly) et de *Pyrococcus furiosus* (CelB). L'hydrolyse est couplée avec un module de recirculation de l'enzyme.. Le procédé utilisé permet d'éviter l'immobilisation de l'enzyme. Inversement, comme c'est un procédé en continu, les risques de contaminations existent et la **haute température** permet de les éviter. De plus elle favorise la production des galactose-oligosaccharides.

La productivité de la conversion du lactose par la SsbetaGly est meilleure que celle assurée par CelB du fait de la plus forte inhibition de CelB par le glucose. Le procédé semble bien adapté à la production des galacto-oligosaccharides avec les deux enzymes. Avec des concentrations initiales de lactose de 45 et 170 g/L les auteurs ont obtenu un niveau de conversion en continue de 80% pendant plus de deux semaines sans contaminations. *I Petzelbauer et al.; Biotechnology & Bioengineering 77 (15FEB02) 394-404*.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

128. Le **tréhalose** est un **disaccharide** avec deux glucoses reliés par leurs extrémités réductrices. Il peut être utilisé comme **édulcorant** et ne donne pas lieu à la **réaction de Maillart** avec les protéines (brunissement de la croûte du pain par exemple). On **ne sait pas le produire en quantités commerciales** et à un **prix raisonnable** pour s'en servir comme

édulcorant. Il faut, soit l'extraire de microorganismes (qui n'en produisent pas des masses), soit le préparer à partir de maltose dans un bioréacteur avec un système multienzymatique pas facile à piloter. (voir le § 157 )

Les enzymes **naturelles** utilisées proviennent usuellement de *Rhizobium* et *Arthrobacter*. Elles ne sont **pas assez thermorésistantes**, or il faudrait pouvoir travailler **au-dessus de 55°** pour éviter les contaminations bactériennes. Il faudrait pouvoir, pour les mêmes raisons, travailler à des **pHs relativement acides**, or les enzymes ne les **supportent pas**. Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo a obtenu l'*US Patent n°6 346 394 (12FEB02)* sur une enzyme recombinante permettant le clivage de tréhalose à partir de sucres non réducteurs. L'enzyme est résistante à des températures relativement élevées, une heure à 85°. Elle dérive d'une enzyme de *Sulfolobus* et supporte donc une température supérieure à 55° et des conditions acides.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

129. Des chercheurs décrivent des techniques permettant de **suivre des enzymes** biologiquement **actives** dans une **colonne**. Ils ont utilisé l'**hydrolase** des **organophosphorés** dont on peut suivre l'**inactivation progressive** face à certaines conditions d'utilisation. Le marqueur est la GFP (Green Fluorescent Protein) qui semble être inactivée réversiblement en même temps que l'enzyme, ce qui est un point plus particulièrement intéressant de l'article. *CF Wu et al.; Biotechnology & Bioengineering 77 (20JAN02) 212-218*.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

130. **Genencor International** a breveté sous l'*US Patent n°6 346 407 (12FEB02)* une **xylanase** provenant d'un *Bacillus* qui est également couvert par le brevet. Elle a l'avantage de fonctionner dans une **gamme de pHs très large** (5 à 11) et avec une  $T_{opt}$  de 50 à 80°C. L'enzyme naturelle a été légèrement modifiée. Elle a manifestement été découverte par la branche achetée à Solvay, il y a quelques années, car les brevets belges *09400706 (26JUL94)* et *09500448 (17MAY95)* sont cités dans les priorités et les auteurs sont belges.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

## L'Agroalimentaire

131. Les **bactéries lactiques** sont utilisées pour les **pains aux levains**, levain dont elles font partie. La composition de ces levains dépend des conditions de culture. En effet on prend une partie de la pâte de la veille qu'on utilise pour amorcer une nouvelle fermentation (le levain) et qu'on utilise les jours suivants pour réaliser la levée de la pâte à pain. Ce n'est donc pas un starter à proprement parlé, car la flore reste active en permanence.

L'utilisation du levain a des **inconvenients** (main d'œuvre) mais beaucoup d'avantages comme l'acidification de la pâte (d'où son nom anglo-saxon de sourdough) qui freine les contaminations, permet une bonne rétention du CO<sub>2</sub> et une résistance du réseau du gluten, une inhibition des amylases et une bonne rétention de l'eau, un gonflement des pentosanes et la solubilisation des phytates par les phytases endogènes.

Des **boulangers pressés** (et économes de leurs efforts, pourtant avec des grands noms) remplacent cette fermentation par une **addition** de divers **acides organiques** (acétique, lactique, tartrique, phosphorique ou citrique). C'est oublier que les bactéries lactiques ont bien d'**autres effets** que l'**acidification**. Le système protéolytique de *Lactobacillus sanfranciscensis* est maintenant connu dans ses grandes lignes, et la protéase à sérine liée à la paroi a une activité qui se corrèle bien avec les conditions de la pâte à levain.

On ne savait pas encore bien si ces **enzymes** peuvent s'attaquer aux **protéines insolubles** comme les **gliadines** et les **gluténines** et si elles peuvent éliminer les **peptides toxiques** pour certaines personnes (encore une raison pour faire interdire les céréales : la **maladie cœliaque** s'attaque à une personne sur 130 à 300 en Europe). Ces peptides toxiques dérivent, par protéolyse partielle des  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\omega$ -gliadines du blé, de l'orge et du seigle.

Des chercheurs italiens ont étudié la protéolyse par quatre souches communes dans ces levains : *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A et *Lactobacillus hilgardii* 51B. Elle a un double effet, d'une part produire **plus de peptides** et d'**acides aminés libres** pour la flore connexe du levain et, d'autre part, **éliminer** les **peptides toxiques** issus des protéines du blé (comme le fragment 31-43 de la gliadine A). Albumines, globulines et **gliadines** sont **hydrolysées**, mais **pas** les **gluténines** (bien utiles pour la texture du pain). Les concentrations de proline et des acides glutamique et aspartique, sont accrues. La souplesse de la pâte est, par ailleurs, bien meilleure par rapport à celle obtenue par acidification chimique.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

132. Les **exopolysaccharides** (EPSs) produits par les **bactéries lactiques** interviennent de façon favorable dans la **texture** des **produits laitiers fermentés**. Il en existe plusieurs types chez *Streptococcus thermophilus*, et l'on découvre de plus en plus d'opérons les concernant. Tous ces opérons contiennent une région plus ou moins conservée, qui intervient dans les régulations, la détermination de la

longueur des chaînes et l'exportation, suivie par une région plus variable codant les glycosyltransférases et les enzymes impliquées dans la polymérisation et l'exportation de polysaccharides. On peut très bien envisager de modifier ces polysaccharides en jouant sur leurs gènes de synthèse.

La première chose à faire est de stimuler fortement leur production qui est très faible. Comme beaucoup de polysaccharides, ils sont polymérisés à partir de UDP-glucides. C'est probablement un des goulets d'étranglement de la production. *S.thermophilus* produit aussi bien de l'UDP-glucose (UDPg<sub>lc</sub>) ou de l'UDP-galactose (UDPg<sub>al</sub>) à partir du lactose, car la bactérie possède la voie de Leloir. L'enzyme reliant cette voie à la glycolyse est la phosphoglucomutase (PGM) qui assure l'interconversion du glucose 6-phosphate (G6P) en glucose 1-phosphate (G1P). Le glucose 1-phosphate de la voie de Leloir peut être utilisé directement en UDPg<sub>lc</sub>, soit épimérisé en UDPg<sub>al</sub>, via le Gal 1-P.

Malheureusement la **plupart** des **souches laitières exportent** leur **galactose**, dont elles n'ont que faire, par un antiport-lactose entrant et galactose sortant. Les enzymes de la voie de Leloir sont de ce fait peu actives chez ces souches. Il faudrait renforcer leur expression.

Le gène *galU* codant l'**UDP glucose pyrophosphorylase** de *Streptococcus thermophilus* LY03 a été cloné par des chercheurs de Lund. Sa **surexpression** n'a aucun effet sur la **production d'EPS** à partir de **lactose**. Par contre si on le surexprime en même temps que *pgmA*, codant la **phosphoglucomutase**, on **double le rendement** par **molécule de lactose**.

Une souche **fermentant** le **galactose**, et qui présente une activité accrue de la **voie de Leloir**, démontre également **une plus forte production d'EPS**. la **surexpression** de *galU* dans cette souche n'améliore que légèrement la production d'EPS, il doit lui manquer une quantité suffisante de substrat. L'**inactivation** de *pgmA* **améliore** sensiblement la **production**, probablement en coupant le déversoir éventuel de la voie de Leloir vers la glycolyse. *F Levander et al.; Applied & Environmental Microbiology* 68 (FEB02) 784-790.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

134. L'important dans la fabrication d'un fromage est certainement (pour le consommateur) la **maturation**, car c'est d'elle que **dépendent** les **arômes** et la **texture**. C'est la période où la flore des starters ou autochtone, la présure et les enzymes du lait complètent leur action. Ceci est particulièrement vrai pour les fromages à flore de surface du fait de la complexité de cette flore.

On peut distinguer, parmi ces derniers, ceux à flore surtout fongique, comme Camembert et Brie, et ceux à flore surtout bactériennes comme Munster, Limburger, Tilsit, Brick. Ces distinctions sont relatives, car on trouve une corynebactérie comme *Brevibacterium linens* (le ferment du rouge) dans les deux. On apporte cette bactérie de diverses façons,

l'une des plus spectaculaires est celle de certaines productions artisanales où l'on essuie le fromage frais avec un chiffon ancestral ayant essuyé depuis des années les fromages et qui, trempé dans une saumure, conserve une flore sélectionnée, au grand dégoût des visiteurs hygiéniques. L'ennui de ce procédé est qu'il peut également entraîner l'inoculation de bactéries comme *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

La maturation de ces types de fromages comporte une succession de flores mal définies. Elle commence par l'apparition de levures qui utilisent l'acide lactique produit par les bactéries lactiques et font ainsi remonter le pH vers 6,0 (voir le *Bulletin de Novembre 2001* §95). Ceci permet l'implantation d'une flore de surface de Microcoques et de Coryneformes (dont *B.linens*) sensibles aux pHs acides.

*B.linens* n'est d'ailleurs pas le seul et on le trouve associé à de nombreuses coryneformes comme d'autres *Brevibacterium*, des *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Rhodococcus*. Des chercheurs britanniques montrent que *B.linens* est même minoritaire dans certains fromages. Il est, en effet, éliminé par d'autres coryneformes ou les staphylocoques présents, et l'on trouve, selon les échantillons, plusieurs autres *Corynebacterium* comme *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium mooreparkense* et *Microbacterium gubbeenense*, et parfois *Corynebacterium flavescens*.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

### Les Pré- et Probiotiques

136. Certains **bioflavonoïdes** sont des **antioxydants** appréciables, et peuvent être considérés comme ayant les mêmes effets que la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol). Comme toujours, on peut soupçonner des interactions entre eux. Des chercheurs coréens ont étudié l'effet de la naringine (4',5,7-trihydroxyflavanone-7 rhamnoglucoside des écorces d'agrumes) et de la vitamine E sur le métabolisme du cholestérol et leur effet antioxydant. Il y a une **complémentation** entre eux en ce qui concerne le taux plasmatique en lipides et même une **synergie** quand le taux de vitamine E est normal. *MS Choi et al.; Annals of Nutrition & Metabolism 45, n°5 (2001) 193-201.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

137. Le **transfert** des **isoflavones** du **soja** dans le **jaune** des **œufs** par la voie **alimentaire** chez le poulet est décrit dans *S Saitoh et al., Bioscience, Biotechnology, Biochemistry 65 (OCT01) 2220-2225.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

138. On trouve des **cellules dendritiques** dans tout le système gastro-intestinal où elles jouent leur rôle de **vigies périphériques**. On peut donc penser qu'elles sont également en première ligne dans les effets probiotiques de la flore intestinale.

On vient de montrer que diverses espèces de *Lactobacillus* exercent des spectres d'activation des DCs très différents. Ils stimulent surtout la **production d'IL-12**. Mais au moins un *Lactobacillus*, *L.reuteri* DSM12246, mauvais inducteur de d'IL-12, **inhibe l'activité d'autres Lactobacillus**. Il inhibe, par exemple, l'induction d'IL-12, IL-6, et TNF- $\alpha$  par

135. La production de **choucroute** est généralement une fermentation **spontanée** basée sur *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus plantarum*. La fermentation se fait dans une saumure à 2% de sel et à 18°. Bien que certains puissent penser que cela marche suffisamment bien pour qu'on ne soit pas obligé de penser à des starters. Mais il y a une fatalité dans ce domaine qui est la standardisation. Il y en a une autre qui mérite une considération: ce sont les **rejets de saumure** liés à cette production. Aussi cherche-t-on à **réduire la concentration de NaCl**. Ceci risque de **bouleverser la flore** si bien établie et de nuire à la qualité. On est donc en train de sélectionner des cultures de *Leuconostoc mesenteroides* destinées à cet usage. On aura donc les difficultés que l'on a connues avec les starters laitiers et leurs bactériophages.

Les premiers bactériophages isolés de la choucroute viennent d'être caractérisés dans une installation industrielle. Il s'agit de neuf espèces appartenant aux Siphoviridés (où tous les phages laitiers et ceux d'*Oenococcus oeni* sont regroupés) et Myoviridés.

Ils sont actifs sur certaines souches de *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum* dont des souches de **starters** de *Leuconostoc mesenteroides*. *SS Yoon et al.; Applied & Environmental Microbiology 68 (FEB02) 973-976.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

*L.casei* CHCC3139. *HR Christensen et al.; Journal of Immunology 168 (01JAN02) 171-178.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

139. L'**adhésion** aux cellules intestinales de *Lactobacillus gasseri* NY0509 est fortement stimulée par la présence de *Lactobacillus casei* NY1301, mais ce n'est pas réciproque. Il devrait donc y avoir une synergie entre ces deux espèces dont on attend des propriétés probiotiques. C'est ce qu'affirment des chercheurs de Nissin Foods. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry 65 (OCT01) 2326-2329.*

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

140. Un brevet intéressant est l'*US Patent n°6 340 482 (22JAN02)* octroyé à la firme ZhiShin, dans le Vermont, comme son nom l'indique. Il conseille d'avaler des **écorces d'oranges bigarades** et de leur parent *Citrus reticulata* (*Citrus aurantium* est un croisement entre *C.maxima* et *Citrus reticulata*), pour **perdre du poids**. Ceci serait dû aux **alcaloïdes** présents (synephrine, hordenine, octopamine, tyramine et N-méthylamine). Les bovins israéliens (notamment des Salers du Neguev) nourris en masse avec des épiluchures d'oranges et qui ont pourtant belle allure auraient dû maigrir. Quant aux quantités d'épiluchures que je devrais manger pour récupérer le tour de taille de ma jeunesse, je n'ai pu le calculer avec les chiffres donnés.

☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺☺ ☺

## La Sécurité Alimentaire

141. L'émergence quasi épidémique d'*Escherichia coli* **O157:H7** comme pathogène entéro-hémorragique humain a renouvelé l'intérêt pour son comportement au travers des bovins. En effet, la bactérie se retrouve également chez bovins, porcins, ovins et volailles. Les bovins sont des **porteurs sains** de la bactérie car les bovins adultes ne possèdent pas les récepteurs vasculaires (des globotriaosylcéramide ou Gb3) de cette bactérie, sauf chez le veau nouveau-né, où ils disparaissent ensuite rapidement. (voir le *Bulletin de Novembre 2000*).

On admet que les rations riches en céréales des bovins limitent la prolifération des entérobactéries dans le rumen du fait de la production abondante d'acides gras volatils divers. L'acidité n'est pas une arme contre ces bactéries, car elles sont acido-résistantes, au moins dans certaines conditions. Dans le reste du tube digestif, les choses ne sont pas si claires et une faible population ruminale suffirait àensemencer régulièrement le reste du tube digestif. On cherche donc à réduire les contaminations fécales.

Les empêcher de proliférer dans le rumen par pilotage de l'alimentation a été envisagé. Des chercheurs de l'University of Nebraska-Lincoln ont travaillé sur un modèle de rumen pour commencer. Ils ont constaté qu'*E.coli* O157:H7 introduite dans un rumen en fonctionnement ne se multiplie pas, mais que si ce milieu est stérilisé, son implantation est possible.

La plupart de ses souches sont incapables d'utiliser le sorbitol. C'est donc un substrat potentiel pour des concurrentes. Effectivement, avec 3 g/L de sorbitol, *E.coli* O157:H7 est éliminée en 72 heures. L-arabinose, tréhalose et rhamnose ont le même effet pour des raisons analogues. Mais, de façon inattendue, des mutants **capables d'utiliser le sorbitol** apparaissent en l'absence de compétition. Il faut donc disposer d'une flore ruminale robuste pour arriver à ses fins. Voilà une approche prébiotique, mais qui risque d'être coûteuse. Comme le sorbitol est, par ailleurs, un bon laxatif du fait de la stimulation de certaines bactéries, j'aurais aimé avoir une analyse de la flore intestinale en plus. *A de Vaux et al.; Applied & Environmental Microbiology* 68 (FEB02) 519-524.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

142. On trouvera dans *K Schumann; Annals of Nutrition & Metabolism* 45, n°5 (2001) 91-101, une **revue** sur les aspects "**sécurité**" du **fer** dans les **aliments**. On a, en effet, beaucoup parlé de pallier les carences en fer, manifestes dans certaines parties du monde. Il faut réaliser que dans le cas contraire les dispositifs homéostatiques de l'intestin sont insuffisants pour empêcher une accumulation dans l'organisme en cas d'excès. Il n'existe **pas** de mécanismes **d'excrétion** en cas de **surcharge**.

Un excès chronique entraîne une fibrose hépatique, du diabète et des ennuis cardiaques. C'est ce qu'on observe avec les **bières domestiques africaines** du

sud du Sahara, qui fournissent 50-100 mg/jour d'une forme hautement assimilable du fer. Une limite supérieure de 25-50 mg/j semble raisonnable. Cette toxicité est liée à la génération de **radicaux hydroxydes** à partir d'**anions superoxydes** qui entraînent un stress oxydatif qui libère à son tour du fer. Il existe encore des querelles sur ce sujet, mais le risque doit être pris en compte.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

143. Certaines **protéines** du **blé** sont **allergènes** (on n'a pas, cependant, encore interdit le blé en vertu du principe de précaution). Ce sont essentiellement des sous-unités (CM2, CM3 et CM16) de l'**inhibiteur tétramérique de l'α-amylase** qui sont responsables de l'asthme dit "des boulangers". Leur absorption intestinale a été étudiée. C'est surtout la **CM3** qui est absorbée. *M Kusaba-Nakayama et al.; Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 65 (NOV01) 2448-2455.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

145. Le **chitosane** (un dérivé de la chitine obtenu par action de la soude) a un effet **antibiotique** dans la **mayonnaise** stockée à 25° contre des contaminants bénins, surtout ennuyeux pour l'aspect de la mayonnaise, comme *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Serratia liquefaciens* ou *Zygosaccharomyces bailii*. *HI Oh et al.; Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 65 (NOV01) 2378-2383.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

146. Une nouvelle **glycoprotéine** de 60 kDa de la **farine de blé** réagissant avec les IgE vient d'être caractérisée. Elle est donc **allergène**, mais elle est éliminée par les traitements des farines spéciales pour allergiques. *J Watanabe et al.; Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 65 (SEP01) 2102-2105. Voir le § .

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

148. ### Les **Bacteroides** sont des gram<sup>-</sup> colonisateurs obligés du colon, dont la densité dans l'intestin est énorme. Ils portent très souvent des **gènes de résistance** aux **antibiotiques**. Ces résistances sont transférées au sein de la flore intestinale normale, mais aussi acquises de bactéries provenant de l'extérieur. On vient d'analyser leur système de conjugaison

Les transposons conjugatifs des *Bacteroides* sont chromosomiques et portent des résistances aux tétracyclines (*tetQ*), et probablement à d'autres antibiotiques. Les gènes *rteABC* régulent le transfert de l'élément Tet. Une exposition à une dose sub-inhibitrice de tétracycline entraîne une augmentation massive du transfert (1 000 à 10 000 fois) de *Tet* et d'autres éléments cohabitant avec lui. On vient de caractériser un **nouvel élément transférable** chez *B. fragilis*. Il possède également un appareil de transfert inductible par la **tétracycline**. *G Vedantam et al.; Journal of Bacteriology* 184, n°3 (FEB02) 728-738.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

## L'Environnement

149. Les **cyclodextrines** sont bien connues (molécules annulaires de 7 glucoses, il en existe de 6 ou 8 glucoses, mais elles sont plus coûteuses). Elles sont produites enzymatiquement par des **cyclodextrine glycosyltransférases** et **modifiables chimiquement** pour des usages précis. On les utilise pour encager des molécules (parfums, arômes etc...) pour lesquelles le prix n'est pas limitant. On pense également les utiliser pour des **extractions de polluants**. Le problème du coût devient alors crucial. Les militaires américains, qui ont dénombré 28 000 sites pollués, ont accordé un contrat de \$830 000 à l'University of Rhode Island pour effectuer une démonstration en grandeur nature. Le procédé comporte un **recyclage des cyclodextrines** après extraction, ce qui en fait l'intérêt. Le premier essai financé est localisé en Virginie. Si cela fonctionne de façon satisfaisante, on pourrait utiliser le procédé sur 500 des sites recensés. *Industrial Bioprocessing* 24 (FEB02).

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

150. Beaucoup de produits nitro-aromatiques sont utilisés (herbicides, insecticides, explosifs, etc...)... L'University of Idaho Research Foundation a breveté, sous l'*US Patent 6 334 954*, un procédé microbien en deux étapes pour les éliminer. Une première étape est **aérobie** pour éliminer l'oxygène du milieu à épurer. Le vrai travail est effectué par des **anaérobies**. La déplétion en oxygène évite, au passage, la **polymérisation oxydative** des amines issues de la dégradation **partielle** des nitroaromatiques. La démonstration est faite sur **Dinoseb** un herbicide (2-(1-méthylpropyl)-4,6-dinitrophénol), qui a été largement utilisé durant une cinquantaine d'années. Il est commode, car la disparition de sa couleur jaune vif facilite le suivi de la dégradation.

La **première étape** aérobie est assurée par un mélange de plusieurs bactéries connues, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Lactobacillus*. L'étape **anaérobie** est assurée par les mêmes (qui sont anaérobies facultatifs), plus des *Bacteroides*, *Fusobacterium* et *Desulfovibrio*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

151. Le **carvacrol** et le **thymol**, présents dans les extraits huileux du thym et de l'origan, inhibent complètement la production des acides gras à chaînes courtes, donc volatils, et de lactate dans les purins en anaérobiose qui confèrent les odeurs bien connues. La totalité des coliformes fécaux est éliminée en 4 jours dans les purins. Les anaérobies sont réduits aux alentours de  $10^7$  cellules/ml. *VH Varel et al.; Applied and Environmental Microbiology* 67 (MAR01) 1366-1370. (Voir le *Bulletin d'Avril 2001*). Le carvacrol a des vertus antiseptiques, car il intervient sur la perméabilité à  $K^+$  et  $H^+$  et dissipe le gradient ionique. *A Ultee et al.; Applied & Environmental Microbiology* 65 (OCT99) 4606-4610. Utilisé à 2,5 g/L., il permet d'**éliminer** une grande partie des **acides gras volatils** (isobutyrate, valérate, isovalérate) ainsi que du crésol, des **lisiers de porcs**. *VH Varel; Current Microbiology* 44 (JAN02) 38-43. Les coliformes disparaissent en deux semaines. La flore des lisiers est manifestement différente de celle du purin car elle réagit différemment (voir l'article de Mars 2001). On ne trouve, en particulier, pas de lactates dans le lisier. De plus, carvacrol et thymol sont stables dans les lisiers en conditions anoxiques pendant plus de 60 jours. Ils n'y sont donc pas métabolisés.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

152. La forte **hydrophobicité** des **biphényles polychlorés** (PCBs) **limite** leur **biodégradabilité** dans les sols contaminés depuis longtemps (ce qui risque de plus en plus d'être le cas pour les sites anciens qui sont nombreux). Il faut donc ajouter des surfactants pour améliorer leur biodisponibilité. Les acides humiques sont des surfactants naturels, pas très efficaces mais gratuits. Des chercheurs italiens ont étudié leur intervention dans un sol modèle avec un consortium microbien connu comme capable de réaliser cette dégradation. Il ne faut pas mettre trop d'acides humiques (1,5%) car au dessus la dégradation et la population baissent. Les Collemboles (arthropodes marqueurs) se portent mieux dans un sol ainsi traité, mais le marqueur végétal *Lepidium sativum* (le cresson) le supporte moins bien. *F Fava et al.; Biotechnology & Bioengineering* 77 (20JAN02) 204-211.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

## La Vie des Sociétés

154. **Apple** annonce la mise à la disposition des chercheurs d'un logiciel **BLAST** mis au point avec **Genentech**. Il fonctionne **cinq fois plus vite** sur un Powermac bi-processeur de 1 GHz que la **version standard** du NCBI (National Center for Biotechnology Information) sur un 2-GHz Pentium 4 selon le Stanford University Genetics Department. On peut télécharger le code à <http://developer.apple.com/hardware/ve/acgresearch.html>. Il fonctionne avec le Velocity Engine de Mac OS X et il est actuellement en cours d'amélioration avec le NCBI. *PRNewswire-FirstCall/ (07FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

155. **Affymetrix** a vendu 280 000 microréseaux GeneChip™ au cours de l'année passée, 40% de plus que l'année précédente. La marge brute, si j'ai bien compris, est de l'ordre de 60% pour ces réseaux. Le système complet a été vendu à 600 exemplaires. Ceci n'empêche pas la compagnie d'afficher des pertes de \$33,1 millions en 2001 contre \$54,0 millions en 2000. *Affymetrix Press Release (30JAN02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

156. **AgraQuest** a lancé un programme de recherches avec l'University of California à San Diego, financé en partie par le Biotechnology Strategic Targets for Alliances in Research. Il s'agit de repérer des **microorganismes** des **grandes profondeurs océaniques** capables de produire des pesticides. C'est le groupe de William Fenical (Scripps Institution of Oceanography, UCSD) qui travaille depuis un moment sur les substances pharmaceutiques issues de ces bactéries qui est engagé.

Fondé en 1996, l'Industry University Cooperative Research Program gère ces initiatives en faveur de l'industrie **californienne**. *AgraQuest Press Release (06FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

157. **Cargill Health and Food Technologies** va incessamment produire industriellement du **tréhalose** comme édulcorant. (voir le § 128). Il n'a que la moitié du pouvoir sucrant du saccharose, il est énergétiquement assimilable, mais plus lentement que les autres sucres. Son principal avantage est de moins stimuler la réponse de l'insuline. Ce serait un aliment pour sportifs. *Cargill Press Release (01MAR02)* et [www.just-food.com](http://www.just-food.com).

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

158. La vie n'est pas facile pour les industriels de l'alimentation. **Conagra** avait dû rappeler une soupe de poulet aux nouilles, ainsi que des filets de porc marinés un mois auparavant, car l'étiquette ne mentionnait pas la présence de lactosérum (allergène potentiel). *Reuters English News Service (07FEB02)* et **Campbell Soup**, ainsi que **Nestlé**, sont obligés de rappeler des soupes à la tomate ou des bases de soupe au poulet du fait de l'absence de mention de la présence de lait et de protéines de soja. *Bloomberg News (09FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

159. **Certis USA**, une filiale de **Mitsui & Co.**, et de **3M Canada** a annoncé une **collaboration** portant sur le développement et la commercialisation de **phéromones pulvérisables** pour les marchés américains et mexicains. Il s'agit de phéromones contre des insectes des **arbres fruitiers**. *PRNewswire (12FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

160. **Degussa** et **Diversa** collaborent dans le domaine des enzymes. Degussa travaille également avec la firme de Nîmes, **Proteus**, par le biais de **Goldschmidt AG** pour développer des bioconversions de silicones et des huiles en surfactants. *Industrial Bioprocessing 24 (FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

161. **Givaudan Flavors and Fragrances Corp.** et **Diversa Corp.** ont signé un accord sur de nouvelles enzymes découvertes et modifiées par Diversa. *Industrial Bioprocessing 24 (FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

162. Un cas amusant est celui de **Donner Corp. International**, une banque d'affaire de Santa Ana, Californie. Elle a signé un Investment Banking agreement avec US Microbics. *U.S. Microbics Press Release (04FEB02)* et recommande fortement, dans

une annonce du 06 Février, l'achat des actions de cette firme. La firme avait reçu, en paiement de ses services, 12 000 actions d'US Microbics. On comprend son enthousiasme.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

163. **EnSolve Biosystems** a obtenu un contrat Small Business Innovative Research de l'armée américaine pour développer un bioréacteur destiné à **dépolluer** des sites contaminés par du trichloréthylène, du perchloroéthylène, du chlorure de vinyle et des explosifs. La firme va adapter sa technique **PetroLinator™** d'élimination des résidus pétroliers des soutes, ballasts et réservoirs de navires, notamment ceux des Coast Guards, qui permettent de "dégazer" sans polluer.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

164. **Genzyme Transgenics** Corporation annonce des résultats en baisse notable, faiblesse due à la perte des revenus sur l'antithrombine III humaine recombinante qui lui venaient de Genzyme Corporation et dont elle a récupéré tous les droits, mais perd les revenus issus de la co-entreprise. La firme veut passer aux phases cliniques des essais sur l'**albumine humaine recombinante** produite dans le lait. Elle cherche des financements pour développer un vaccin contre *Plasmodium falciparum* basé sur l'antigène MSP-1 (Merozoite Surface Protein 1) dont la publication dans le numéro du 18 Décembre 2001 fait état. *Genzyme Transgenics Press Release (19FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

165. **IGEN International** a gagné son procès en première instance contre Roche Diagnostics, avec un montant coquet de dommages (\$505 millions) à propos de la licence de la technique **Origen™**. Roche devra, en effet, non seulement abandonner tous ses droits sur la technique, mais encore céder gratuitement tous les développements que la firme y avait apportés, notamment avec les systèmes de diagnostics Elecsys™. Ce transfert comporte celui de la PCR utilisée par le procédé!!!. *PRNewswire-FirstCall via COMTEX (19FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

166. Des **porcelets clonés** par transfert nucléaire par **Infigen** et **Genmark** à partir de cellules somatiques de deux **verrats primés** ont été présentés. "The Man" est un Yorkshire célèbre de Prairie State Semen qui l'a acheté pour \$77 000 en 2000, et ses descendants clonés sont nés le 14 Janvier. L'autre verrat "401K", acquis en 1997 pour \$43 000 est mort, mais ses descendants clonés sont nés le 25 Décembre 2001, et les 6 et 14 Janvier. *Infigen Press Release (11FEB02)*.

☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

167. **Maxygen** vient de fonder une filiale, **Codexis**, qui devrait commercialiser des produits chiraux à haute valeur ajoutée pour les industries biologiques et chimiques en s'appuyant sur la technique d'évolution dirigée de la maison-mère, MolecularBreeding™, protégée par 60 brevets qu'elle défend avec énergie (voir les ennuis d'Enchira Biotechnology au Bulletin de Janvier §152). *Maxygen Press Release (26FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

168. **Merck KGaA** va vendre ses activités de **production** de la **vitamine C**. Il serait possible que **BASF** soit cliente. Merck n'arrive pas à rendre rentable cette production. *Bloomberg News (12FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

169. Les cultures transgéniques couvrent 53 millions d'hectares et les produits de **Monsanto** et dérivés de ces derniers couvrent 48 millions d'hectares, avec 34 aux Etats-Unis. Deux produits de Monsanto proches de la commercialisation sont le maïs YieldGard Rootworm et le coton Bollgard II. *Monsanto Press Release (11 et 14FEB02)*. L'Afrique du Sud a approuvé en 2001 l'utilisation des sojas Roundup Ready™, avec 7 000 hectares plantés dès maintenant, l'importation avait été autorisée auparavant. L'Indonésie a approuvé le coton Bollgard™ et l'Argentine le coton Roundup Ready™. Des essais préliminaires aux autorisations sont en cours un peu partout. Ce qui est intéressant c'est qu'une variété recombinante de patate douce résistante aux virus est essayée au Kenya.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

170. **Monsanto** vient d'annoncer le recrutement de Sharon R. Long, professeur à Stanford depuis 1992, bien connue en France car elle a reçu le prix George Morel de l'INRA pour ses travaux sur la fixation de l'azote. *Monsanto Press Release (22FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

171. **Monsanto** n'a pas les pieds dans le même sabot et possède une filiale consacrée à la **génétique porcine**, DeKalb Choice Genetics, qui va prendre le nom de **Monsanto Choice Genetics Inc.** Les recherches dans ce domaine ont décuplé depuis l'acquisition de cette filiale, avec DeKalb Genetics en 1998. La firme a annoncé une carte génétique du porc en Janvier 2001. En Décembre 2001, la filiale canadienne de Monsanto a acquis Unipork Genetics de United Grain Growers Ltd. *Monsanto Press Release (28FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

172. Les résultats d'essais réalisés en 1997 et 1998, destinés à mesurer l'efficacité d'une expression de la **δ-endotoxine Cry 1Ab** (événement BT-11 de **Novartis** contre *Ostrinia nubilalis*, *Helicoverpa zea* et *Spodoptera frugiperda*) dans des hybrides de **maïs doux** sont décrits dans *EC Burkness et al.; Crop Protection 21 (MAR02) 157-169*. Ces essais ont été réalisés en de multiples sites dans l'Illinois, le Minnesota et le Wisconsin et ont comparé des isolignées les unes normales les autres recombinantes. L'effet est notable, sauf dans les années où l'infestation est faible. Il est total sur les chenilles d'*O.nubilalis*. Le bilan technique c'est 75 à 99% des épis frais vendables (contre 14-34% pour les épis normaux) et 94 à 99% d'épis utilisables industriellement (contre 41-56%). Ce qui est intéressant, c'est la plus faible variabilité des résultats pour les maïs Bt. Les calculs économiques n'ont pas encore été publiés.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

173. **Paradigm Genetics**, après avoir éliminé son fondateur, annonce qu'une étape du contrat sur les herbicides avec Bayer a été franchie. Le contrat avait été renouvelé pour cinq ans. *Paradigm Genetics Press Release (06FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

174. Les **phytostérols** sont des intermédiaires dans la production de substances pharmaceutiques. On les utilise aussi dans le domaine des **nutraceutiques**, notamment pour abaisser le taux sanguin de cholestérol. **Phyto-Source** qui est une co-entreprise entre **Medi-Tech** et **Chusei USA** construit une usine d'extraction à partir du bois de ces stérols pour l'alimentation.

Le produit est dénommé FM-VP4 et c'est un inhibiteur du transport du cholestérol. C'est un phytostanol modifié (hydrogéné si j'ai bien compris). URL: [www.forbesmedi-tech.com](http://www.forbesmedi-tech.com).

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

175. **Plexus Vaccine**, de San Diego, a reçu du ministère américain de la défense un contrat pour le développement d'un **vaccin** contre la **peste**. *PRNewswire (08FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

176. Alan Colman, le directeur de la recherche de **PPL Therapeutics** a démissionné et va rejoindre **ES Cell International** (ESI) de Singapour. PPL veut, en effet, se séparer de sa branche consacrée aux cellules souches humaines. ESI est, d'ailleurs, sur les rangs pour un achat.

PPL veut se recentrer sur les protéines en cours de production dans le lait: α-1-antitrypsine, fibrinogène et lipase activée par les sels biliaires. *PPL Therapeutics Press Release (28FEB02)*.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

177. **ProdiGene** produit de la **trypsine** par kilogrammes dans des **plantes recombinantes**. Utilisée dans des cultures de tissus et dans la préparation de peptides pharmaceutiques elle est traditionnellement extraite de pancréas animaux, avec les risques de pathogènes liés. Produite dans des plantes, elle peut prétendre à une plus grande sécurité. D'autres protéines sont en développement, mais la firme n'est pas très discrète sur le sujet. *ProdiGene Press Release (13FEB02)*.

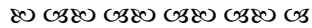
୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

178. **Symbiontics** a mis au point sa technique de **ciblage d'enzymes exogènes** vers les **lysosomes** de cellules choisies. Elle est dénommée Glycosylation Independent Lysosomal Targeting.

Elle utilise un ciblage, grâce à des peptides, vers des récepteurs périphériques des cellules, récepteurs qui sont ensuite internalisés. *PRNewswire (28FEB02)*. Cette technique est destinée à corriger des maladies lysosomales, mais elle pourrait certainement être utilisée dans d'autres cas.

୧୦ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩ ୨୩

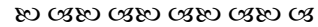
179. **Tate & Lyle** va lancer la commercialisation du sucralose (1',4',6'tridésoxy-trichloro-galactosucrose, édulcorant non cariogène) en Grande Bretagne, dès que les autorisations nécessaires seront obtenues. Il est déjà autorisé aux Etats-Unis au Canada et en Australie. Il est 600 fois plus sucrant que le saccharose. Le nom commercial est Splenda™. *Tate & Lyle Press Release (26FEB02)*.



180. **U.S.Microbics** annonce que sa filiale **Sub-Surface Waste Management** a commencé les travaux de **biodépollution pétrolière** du site de Chevron à Charleston, en Caroline du Sud. La technique a déjà été utilisée en divers sites, dont les Galapagos (voir le *Bulletin d'Avril 2001*).

Le contrat est de \$167 000 et devra durer 12 à 18 mois et les paiements seront effectués en fonction des résultats intermédiaires. *U.S.Microbics Press Release (27FEB02)*.

Une autre filiale, **XyclonyX**, a mis au point un procédé de **recyclage de charbon actif** en le traitant par un consortium de microorganismes dévorant les hydrocarbures. Le procédé est moitié moins cher que le traitement classique, peut s'appliquer au MTBE, et la totalité du carbone est récupéré. *U.S.Microbics Press Release (8 et 12FEB02)*. Il a été appliqué à une raffinerie de pétrole.



## La Politique

181. Une discussion des **standards de qualité** des **vaccins** est parue dans *J Milstieng et al.; Vaccine 20 (15JAN02) 1000-1003*. Elle est complétée par une polémique intéressante sur la sécurité des vaccins face à leur nécessité. *D Steele et al.; Vaccine 20 (22FEB02) 1481-1482* d'une part, et *G Lonergan et al.; Vaccine 19 (15AUG01) 1*, de l'autre. Ces derniers protestaient avec vigueur contre l'autorisation, en Amérique du Nord, d'un **vaccin** contre les **rotavirus** (RotaShield®) contre une maladie qui ne cause que 20-40 morts par an. Le vaccin avait été autorisé en Août 1998, et retiré en Novembre 1999 à cause d'effets secondaires. D Steele demande aux détracteurs de venir faire un tour dans leurs institutions en **Afrique**. C'est toute la querelle sur les vaccins probablement **inutiles** dans les pays **développés**, mais qui y trouvent une clientèle suffisante, confiante dans les autorisations. Ils peuvent être bien utiles dans les pays **en développement**, où les contaminations par ces virus sont ubiquistes et valent la peine d'être **utilisés** même s'il existe un **danger potentiel**. Le vaccin a été donné à des enfant qui n'en avaient pas besoin, au lieu d'être distribué aux enfants qui en ont le plus grand besoin. La mortalité enregistrée dans le tiers monde est de l'ordre du million de personnes. En Afrique cela représente 140 000 enfants de moins de 5 ans qui meurent de cette maladie.

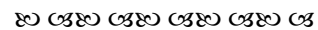
Dans les pays **développés** le **coût économique** de la maladie, **et non** sa **gravité**, a **justifié l'autorisation** du vaccin. C'est autre chose dans les pays du tiers-monde. La sécurité du vaccin n'a pas le même sens dans les deux cas. Ce vaccin a été demandé depuis 1980 par l'OMS, et on ne peut considérer les diarrhées infantiles liées aux rotavirus comme des maladies mineures, que si on n'a en vue qu'une partie très restreinte de l'humanité. C'est donc un vaccin avec des risques (comme beaucoup de vaccins) distribué sur le **mauvais marché**, si on se réfère aux aspects santé. Le vaccin a été retiré du marché avant même une évaluation dans les pays du tiers monde. Il est vrai qu'aucun pays de cette zone n'acceptera un vaccin interdit dans les pays développés, faute de personnes capables d'évaluer le risque. La même tragédie est en train de se renouveler pour le prochain vaccin.



182. L'**Institute of Forest Biotechnology** du North Carolina Biotechnology Center vient de recruter Ed Makowski qui était vice president du développement commercial d'**Aventis CropScience** à Research Triangle Park.

C'est un centre à but non lucratif qui travaillera sur les applications des biotechnologies à la forêt avec leurs aspects sociaux, écologiques et économiques.

Il se consacrera à une approche scientifique des risques écologiques, à la sauvegarde des espèces pérennes menacées et la dissémination des informations générales au grand public et techniques au milieu scientifique. *Industrial Bioprocessing 24 (FEB02)*.



183. La question de la **publication** des informations **génétiques** et l'**accès aux souches** des microorganismes susceptibles d'être utilisés dans la **guerre biologique** divise le milieu scientifique. Une **lettre à l'éditeur** de *RH Ebright et al.; Nature 415 (24JAN02) 364*, traite de la **détention** de ces organismes. Elle est suscitée par les investissements massifs du NIH dans ce domaine, qui va élargir le monde des pratiquants. Elle recommande de **limiter** le nombre de **centres** habilités à **détenir** et à transférer ces agents potentiels, tant qu'un certain nombre de mesures, que les auteurs détaillent, ne sont pas prises pour en contrôler l'utilisation au sein des laboratoires. C'est assez kafkaïen car, par exemple, une personne ne pourrait travailler **seule** dans une pièce, par exemple. On comprend assez bien cette réaction dans la mesure où le charbon de Septembre dernier était d'origine américaine. Son efficacité pour des agressions sur le plan mondial reste plus douteuse. Elle va à l'encontre d'une stratégie basée sur la **supériorité scientifique** incontestable des américains dans beaucoup de domaines, et la neutraliserait en limitant excessivement les échanges au sein de la communauté grâce à une bureaucratie inévitablement pesante de façon à ne pas être considérée comme laxiste, comme on a pu le voir, dans d'autres domaines techniques, à Lawrence Livermore.

