



*Les Biosciences  
en Région  
Centre Val de Loire*

**ACTES**  
*du*  
**29<sup>ème</sup> Colloque**  
**BIOTECHNOCENTRE**

**13-14 Octobre 2016**  
*Seillac (Loir et Cher)*

*Avec le concours du Conseil Régional*



[Tapez ici]

**Christian ANDRES**, Université de Tours, [andres@med.univ-tours.fr](mailto:andres@med.univ-tours.fr) - **Hélène BENEDETTI**, CBM-CNRS Orléans, [helene.benedetti@cnrs-orleans.fr](mailto:helene.benedetti@cnrs-orleans.fr) - **Catherine BEAUMONT** INRA Nouzilly, [catherine.beaumont@tours.inra.fr](mailto:catherine.beaumont@tours.inra.fr), **Marc BERTRAND**, Technologie Servier, [marc.bertrand@fr.netgrs.com](mailto:marc.bertrand@fr.netgrs.com) - **Catherine TARAGNAT**, INRA Nouzilly, [catherine.taragnat@tours.inra.fr](mailto:catherine.taragnat@tours.inra.fr) - **Franck BRIGNOLAS**, Université d'Orléans, [franck.brignolas@univ-orleans.fr](mailto:franck.brignolas@univ-orleans.fr) - **Norbert BROMET**, Biotec Centre, [bromet.n@gmail.com](mailto:bromet.n@gmail.com) - **Bertrand CASTAING**, CBM-CNRS Orléans, [castaing@cnrs-orleans.fr](mailto:castaing@cnrs-orleans.fr) - **Jean-Claude CHENIEUX**, Université de Tours, [chenieux@univ-tours.fr](mailto:chenieux@univ-tours.fr) - **Jean-Louis DACHEUX**, UMR INRA CNRS Nouzilly, [jean-louis.dacheux@orange.fr](mailto:jean-louis.dacheux@orange.fr) - **Nicolas DUBOULOZ**, Région Centre, [nicolas.dubouloz@regioncentre.fr](mailto:nicolas.dubouloz@regioncentre.fr) - **Sophie EHRHARDT**, polepharma, [sophie.ehrhardt@polepharma.com](mailto:sophie.ehrhardt@polepharma.com) ; **Francis GAUTHIER**, Université de Tours, [francis.gauthier@univ-tours.fr](mailto:francis.gauthier@univ-tours.fr) - **Nathalie GUIVARCH**, Université de Tours, [nathalie.guivarch@univ-tours.fr](mailto:nathalie.guivarch@univ-tours.fr) - **Michel MONSIGNY**, CNRS Orléans, [monsigny@cnrs-orleans.fr](mailto:monsigny@cnrs-orleans.fr) - **Henri SALMON**, INRA Nouzilly, [hsalmoncr@gmail.com](mailto:hsalmoncr@gmail.com) - **Marie-Claude VIAUD-MASSUARD**, Université de Tours, [marie-claude.viaud-massuard@univ-tours.fr](mailto:marie-claude.viaud-massuard@univ-tours.fr)

*Présidente* : **Hélène Bénédicti** - Mél : [helene.benedetti@cnrs-orleans.fr](mailto:helene.benedetti@cnrs-orleans.fr)

*Secrétariat* : **Nathalie Riche** - Mél : [biotechnocentre@sfr.fr](mailto:biotechnocentre@sfr.fr)

Chers participants, chers collègues,

Bienvenue au 29<sup>ème</sup> colloque de Biotechnocentre.

Ce colloque s'inscrit dans la mission de notre association de participer à l'animation scientifique dans le domaine des Sciences du Vivant en Région Centre Val de Loire. Afin de favoriser les contacts et les échanges, le colloque se déroule traditionnellement sur 2 jours dans le cadre convivial du Domaine de Seillac (Loir et Cher).

Comme chaque année, il rassemble des chercheurs académiques et des chercheurs du privé de la Région mais aussi de nombreux doctorants appartenant à l'école doctorale SSBCV 549 (Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant) et il leur permet d'exposer leurs travaux ou de présenter leur entreprise sous forme de conférence ou de posters. Il constitue ainsi un reflet relativement complet des activités scientifiques régionales qui par essence sont très diverses et couvrent différents domaines des sciences du vivant : biologie végétale, biologie animale, microbiologie, biologie cellulaire et moléculaire, chimie, génétique, bioinformatique, santé humaine, etc...

Cette multidisciplinarité fait toute l'originalité de ce colloque. Outre un enrichissement de la culture générale et une bonne vision de la diversité du tissu scientifique local, cette multidisciplinarité peut aussi favoriser l'émergence de projets originaux et innovants.

Mais est important que nous ne restions pas centrés sur nous-même, à la fois pour satisfaire notre curiosité et nous enrichir de ce qui se fait à l'extérieur de la Région mais aussi pour y faire connaître l'ensemble de nos travaux dans diverses disciplines. C'est la raison pour laquelle, le colloque Biotechnocentre accueille toujours des invités extérieurs issus eux aussi de différents domaines de la biologie.

Cette année, avec 25 conférences différentes et près de 58 posters, le colloque affiche une forte participation. Nous espérons que les conférences vous passionneront et qu'avec les posters elles susciteront un maximum d'échanges et de discussions.

Avant de vous souhaiter un excellent colloque 2016, je voulais très vivement remercier le Conseil Régional de la Région Centre Val de Loire pour leur soutien récurrent à notre association et sans qui la réalisation de ce colloque serait impossible. Je remercie aussi l'ensemble des organismes publics et privé qui ont contribué par leur aide financière à la réalisation de ce 29<sup>ème</sup> colloque.

Bons échanges et bon colloque !

Hélène Bénédetti

Présidente de Biotechnocentre

# Conférences

**1- Implication de la connexine 43 dans la capacité invasive des tumeurs cérébrales**

*Marc MESNIL*

**2- La modélisation de la signalisation calcique des neurones à GnRH par un processus de Markov par morceaux (shotnoise)**

*Anne DUITTOZ*

**3-Stabilité des biomédicaments, projet STABIOMED, Contrat Région Centre**

*Nathalie HEUZE-VOURCH'*

**4- Implication du canal sodique NaV1.5 dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires humaines**

*Frédéric GRADEK*

**5- Involvement of human kallikrein-related peptidase 5 in human flu**

*Melia MAGNEN*

**6- Caractérisation des voies de signalisation neuronales associées au récepteur synaptique PTCHD1**

*Dévina UNG*

**7- Radiations ultraviolettes et cancers de la peau: un rôle pour les UVA?**

*Evelyne SAGE*

**8- Approches transcriptomiques : outils informatiques pour des problèmes biologiques**

*Thomas DUGE DE BERNONVILLE*

**9- Recherche d'alternatives naturelles aux antioxydants, projet NaturACTIV, Contrat Région Centre-Val de Loire**

*Christophe HANO*

**10- Présentation de la startup « Mc SAF » : Chemical Tools for Bioconjugation and Biodrugs**

*David BONNAFOUS*

**11- Étude des propriétés génétiques et fonctionnelles des variants du virus de l'hépatite C lors d'un événement de transmission**

*Thibault GUINOISEAU*

**12- Modulation des fonctions des cellules dendritiques par des anticorps bispécifiques ciblant les récepteurs de l'immunité innée**

*Lucille LAMENDOUR*

**13- Caractérisation d'un transporteur ABC de zinc chez *Streptococcus agalactiae***

*Pauline MOULIN*

**14- De la programmation moléculaire aux traitements ciblés des cancers**

*Sébastien PAPOT*

**15- Sucres et Soufre : un bon mélange pour la biocatalyse**

*Richard DANIELLOU*

**16- Conservation des gamètes mâles dans l'oviducte de poule, projet OVISPERM, Contrat Région Centre-Val de Loire**

*Nadine GERARD*

**17- Présentation du Centre de formation Bio<sup>3</sup>Institute**

*Audrey MUNOS*

**18- La physioxie : un paramètre essentiel dans la régulation de la mélanogenèse**

*Shalina HASSANALY*

**19- Développement de GAINS 1.0 : Greenpharma Automated Identification of Natural Structures**

*Gloriane JOURAVEL*

**20- LuWRKY36, a flax transcription factor, is involved in the regulation of lignan synthesis in response to a fungal elicitor**

*Lucija MARKULIN*

**21- Transfert du bénéfice associé à un entraînement exécutif sur les performances en mémoire épisodique chez des adultes âgés**

*Lucille BURGER*

**22- Les enzymes de réparation de l'ADN, de nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancer et anti-maladies neurodégénératives : approche *in silico***

*Charlotte RIEUX*

**23- Synthèse et analyse de dérivés de  $\beta$ -cyclodextrine régiofonctionnalisés par des nouveaux ligands pyridine carboxylate pour une application en IRM**

*Celia SAPPEI*

**24- CRISPR-cas9 : de la découverte aux applications biotechnologiques; une véritable révolution**

*Philippe LANOTTE*

**25- L'univers en expansion des virus géants**

*Chantal ABERGEL*

# ***CONFERENCES***

## Implication de la connexine 43 dans la capacité invasive des tumeurs cérébrales

Marc MESNIL

Equipe « Implications Physiologiques et Physiopathologiques des Connexines, IP2C »  
Laboratoire « Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, STIM » – ERL 7368 – CNRS  
Université de Poitiers, Pôle Biologie Santé – Bât. B36  
1 rue G. Bonnet – TSA 51 106, 86073 Poitiers Cedex 09, France.

Le glioblastome (gliome de grade IV) est la tumeur cérébrale la plus fréquente chez l'adulte. Elle demeure incurable du fait de sa récurrence due principalement à ses capacités invasives. Depuis longtemps, la protéine de structure des jonctions gap, Cx43, est suspectée d'être impliquée dans la progression et l'évolution des gliomes. Par une étude de 85 gliomes depuis le grade II au grade IV, nous avons confirmé que la présence de la Cx43 diminue globalement avec le grade tumoral. Cependant, une analyse plus fine réalisée *in situ* a révélé que la Cx43 reste présente dans la majorité des glioblastomes (60%). Cette présence reflète l'hétérogénéité de ces tumeurs car la Cx43 était soit absente ou cytoplasmique, voire nucléaire dans les cellules d'un même glioblastome. Une analyse par Western blot suggère que le signal nucléaire proviendrait de l'extrémité carboxyle de la Cx43 sans pour autant apporter d'indications concernant le rôle possible de ces différentes localisations. En associant ces observations réalisées *in situ* avec des données obtenues expérimentalement, il semble que l'absence de Cx43 favorise la prolifération cellulaire alors que sa présence augmenterait la capacité invasive des cellules de glioblastome. Cette dernière hypothèse a été confirmée par la détection de Cx43 dans les invadopodes (structures invasives) de cellules dérivant d'un glioblastome humain (cellules U251). De plus, par l'utilisation de ce modèle cellulaire, il était évident que la formation des invadopodes est associée au niveau de présence de la Cx43 alors que la fonction « hémicanal » de cette protéine empêche ce processus. Des données préliminaires suggèrent que la Cx43 permet l'interaction entre deux protéines, src et la cortactine, nécessaires à la polymérisation de l'actine et donc à l'élongation des invadopodes indépendamment de sa fonction classique de communication intercellulaire par jonctions gap. La confirmation de ces résultats pourrait permettre de cibler ce processus en vue d'empêcher la formation de ces structures nécessaires à la capacité invasive des glioblastomes.

## La modélisation de la signalisation calcique des neurones à GnRH par un processus de Markov par morceaux (shotnoise).

Duittoz, AH<sup>1</sup>, Fleurot R<sup>1</sup>, Chevrot G<sup>4</sup>, Georgelin, C<sup>2</sup>, Biermé, H<sup>3</sup>, Constant C<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR7247 INRA-CNRS-IFCE-Université de Tours;

<sup>2</sup>Laboratoire de Mathématiques et Physique Théoriques UMR CNRS Université de Tours; <sup>3</sup>Laboratoire de Mathématiques UMR CNRS-Université de Poitiers; <sup>4</sup> Maison Interdisciplinaire des Systèmes Complexes

La neurohormone GnRH contrôle la reproduction chez les vertébrés. Son mode de sécrétion pulsatile est indispensable au fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadotrope. Alors que de nombreux travaux sur des modèles de sécrétion neuroendocrine ont mis en évidence l'importance du calcium intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$  dans le phénomène de sécrétion neuroendocrine, le lien entre les variations de  $[Ca^{2+}]_i$  (période 10-20sec), l'entrée de  $Ca^{2+}$  durant les potentiels d'action (période 100-300msec) et la sécrétion de GnRH (période 18-25 min) n'est pas encore compris. Modèle biologique : neurones à GnRH en culture primaire à partir d'explants de placodes olfactives d'embryons de souris GnRH-GFP (Age embryonnaire E11,5). La mesure des fluctuations de  $[Ca^{2+}]_i$  est réalisée par imagerie en time lapse à l'aide d'une sonde fluorescente. Modélisation : les fluctuations de  $[Ca^{2+}]_i$  sont modélisées par un processus de Markov déterministe par morceaux de type shotnoise. Résultats: La distribution des événements  $[Ca^{2+}]_i$  enregistrés (sauts) suit une distribution de Poisson, ce qui suggère l'existence d'un processus stochastique sous-jacent. Des épisodes de synchronisation des événements impliquant plus de 30% des neurones sont observés toutes les 20 minutes, la sécrétion de GnRH est corrélée avec l'occurrence de ces événements de synchronisation. La simulation du  $[Ca^{2+}]_i$  par un processus de shotnoise dont les paramètres sont estimées à partir des valeurs mesurées dans l'expérience, ne permet pas de retrouver ces événements de synchronisation impliquant plus de 30% des neurones. Ceci suggère l'existence d'un événement extérieur qui participe à cette synchronisation. Le blocage des récepteurs à la GnRH des neurones à GnRH ne modifie pas la fréquence des événements  $[Ca^{2+}]_i$  mais bloque l'apparition des événements de synchronisation. Conclusion : ces résultats suggèrent que le GnRH lui-même est impliqué dans la synchronisation et dans la genèse du pulse de sécrétion de GnRH et donc d'une régulation paracrine.

Thème : Reproduction

Mots clés : GnRH; calcium intracellulaire; neuroendocrinologie; modélisation

## **Stabilité des biomédicaments projet STABIOMED Contrat Région Centre**

Renaud Respaud<sup>1</sup>, Thierry Moreau<sup>1</sup>, Marie-Claude Viaud-Massuard<sup>2</sup>, Patrick Midoux<sup>3</sup>, Alain Le Pape<sup>4</sup>,  
Nathalie Heuzé-Vourc'h<sup>1</sup>

1. CEPR INSERM U1100, Tours, 2. GICC, CNRS 6239, Tours, 3. CNRS UPR 4301, Orléans, 4. CNRS UPS 44, Centre d'imagerie du Petit animal, Orléans

Le traitement des pathologies respiratoires chroniques et aiguës représentent un enjeu majeur, au plan mondial. C'est à la fois un enjeu de santé publique : l'OMS estime que la BPCO (Broncho-pneumopathie chronique obstructive) représentera la 3ème cause de mortalité dans le monde en 2020 ; et un enjeu économique : pour la seule Europe, le coût économique total des maladies pulmonaires est de 102 milliards d'euros/an. Dans ce contexte, il est important d'envisager des stratégies pour améliorer le bénéfice thérapeutique et réduire le coût de la prise en charge des patients.

Le projet STABIOMED, qui regroupe 5 équipes de recherche de la Région Centre, s'est intéressé à l'inhalation pour délivrer les médicaments directement dans le poumon, par une voie non invasive. Cette voie d'administration est actuellement très explorée par les industriels, comme alternative à la voie systémique, pour délivrer plus efficacement de nouvelles classes de médicaments. Les bio-médicaments représentent aujourd'hui un enjeu considérable en thérapeutique humaine et occupent une place croissante dans l'innovation. Ils représentent 30 à 40% des nouveautés mis à la disposition des malades, et plus du tiers des médicaments en développement. Aujourd'hui seulement une protéine thérapeutique, la Dornase alpha, est délivrée par voie inhalée dans le traitement de la mucoviscidose. Ceci peut s'expliquer par la complexité de ce mode d'administration, qui requiert la mise en suspension du médicament dans un milieu gazeux sous forme de fines particules (aérosol) et le manque de connaissance sur le devenir des biomédicaments inhalés après dépôt dans le tractus pulmonaire.

Le projet STABIOMED s'est intéressé à la stabilité et au devenir plusieurs types de biomédicaments - anticorps, protéine recombinante et acides nucléiques encapsulés.

Les résultats obtenus ont permis la publication d'articles originaux, de communications orales et la mise en place de nouveaux partenariats publics-privés entre les acteurs académiques de la région Centre et des entreprises nationales et internationales.

## **Implication du canal sodique Nav1.5 dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires humaines**

Frédéric GRADEK<sup>1</sup>, Emeline BON<sup>1</sup>, Lucie BRISSON<sup>1</sup>, Virginie DRIFFORT<sup>1</sup>, Stephan CHEVALIER<sup>1</sup>, Sébastien ROGER<sup>1</sup> & Pierre BESSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer; Université François-Rabelais de Tours, France

L'expression anormale de canaux sodiques dépendants du voltage est impliquée dans l'invasivité de cellules cancéreuses issues de différents carcinomes. L'expression du canal sodique Nav1.5 dans les cancers du sein est corrélée au développement métastatique et à une diminution de la survie des patientes. Nous avons montré que l'activité du canal Nav1.5 potentialise l'invasivité mésenchymateuse des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 en augmentant l'activité d'efflux de protons par l'échangeur Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> NHE1 et la dégradation de la matrice extracellulaire par des cathepsines à cystéine. Chez la souris, lorsque l'activité de Nav1.5 est inhibée ou son expression diminuée dans les cellules cancéreuses, la colonisation métastatique des organes est inhibée. L'expression et l'activité de ce canal semblent augmenter l'expression de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces différents résultats indiquent que le canal Nav1.5 pourrait être impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses mammaires et semble être une cible d'intérêt dans la détection et le traitement des carcinomes invasifs.

## Involvement of human kallikrein-related peptidase 5 in human flu

Melia Magnen\*<sup>1,2</sup>, Fabien Gueugnon\*<sup>1,2</sup>, Antoine Guillon<sup>1,2</sup>, Thomas Baranek<sup>1,2</sup>, Agnès Petit-Courty<sup>1,2</sup>, Alison A. Humbles<sup>3</sup>, Mustapha Si-Tahar<sup>1,2</sup>, and Yves Courty †<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1100, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Faculté de Médecine, 37 000 Tours, France ; <sup>2</sup> Université François Rabelais, Tours, France ; <sup>3</sup> MedImmune, Gaithersburg, MD, USA.

The proteolytic activation of influenza virus HA is an indispensable prerequisite for inducing fusion of the viral envelope with endosomal membranes and therefore is essential for viral infectivity. Previous studies indicated that HA cleavage is likely driven by either membrane-bound or extracellular serine-proteases residing in the respiratory tract. However, there is still uncertainty regarding which proteases are critical for HA activation of seasonal influenza A viruses (IAV) in human. The kallikrein-related peptidases (KLK) constitute a family of 15 secreted serine-proteases and we examined the potential involvement of KLK 1, 5, 8, 13 and 14 in the proteolytic activation H3N2 IAV subtype. All these 5 proteases were detected in tracheal aspirations from patients in intensive care unit but only KLK5 was found elevated in the samples from patients suffering from seasonal flu. KLK1, 13 and 14 were positively correlated with the neutrophil abundance while KLK5 was not. The KLK5 increase was likely due to an enhanced secretion by the airways, because IAV infection induced RNA and protein expression of KLK5 in primary bronchial cells *in vitro*. KLK1, KLK5 and KLK14 were able to cleave recombinant HA from different strains within the H3 subtypes, but only KLK5 was efficient to promote infectivity of a particular IAV strain of the H3N2 subtype in both MDCK cells and mice. Our data support the involvement of KLK5 in the proteolytic activation of seasonal H3N2 viruses in human.

Thème : Lung infection

Mots-clés : influenza A virus, kallikrein, protease, lung.

## Characterization of the neuronal signalling pathways associated with postsynaptic receptor PTCHD1 and impaired in neurodevelopmental disorders

Dévina Ung<sup>1,2</sup>, Giovanni Iacono<sup>3</sup>, Hamid Méziane<sup>4</sup>, Marie-Amélie Papon<sup>1,2</sup>, Martijn Selten<sup>5</sup>, Jon-Ruben van Rhijn<sup>5</sup>, Emmanuelle Blanchard<sup>1,6,7</sup>, Rodrick Montjean<sup>8,9,10,11</sup>, Julien Rucci<sup>8,9,10,11</sup>, Stéphane Martin<sup>12</sup>, Kirti Mittal<sup>13</sup>, Andrew Fleet<sup>14</sup>, Marie-Christine Birling<sup>4</sup>, Sylviane Marouillat<sup>1,2</sup>, Ronald Roepman<sup>15,16</sup>, Mohammed Selloum<sup>4</sup>, Aline Lux<sup>4</sup>, Rose-Anne Thépault<sup>1,2</sup>, Paul Hamel<sup>14</sup>, John B Vincent<sup>13</sup>, Olivier Dorseuil<sup>8,9,10,11</sup>, Henk G Stunnenberg<sup>3</sup>, Pierre Billuart<sup>8,9,10,11</sup>, Nael Nadif Kasri<sup>5</sup>, Yann Hérault<sup>3,17,18,19</sup>, Frédéric Laumonier<sup>1,2</sup>

1. University François-Rabelais, Tours, France; 2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U930, Tours, France; 3. Department of Molecular Biology, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands; 4. PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), CNRS, INSERM, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France; 5. Department of Cognitive Neuroscience, Department of Human Genetics, Radboudumc, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Nijmegen, the Netherlands; 6. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U966, Tours, France; 7. Centre Hospitalier Régional Universitaire, Tours, France; 8. Institut Cochin, 24 rue du Fg St Jacques, Paris, France; 9. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1016 Paris, France; 10. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8104, Paris, France; 11. University Paris Descartes, Paris, France; 12. Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR7275, University of Nice – Sophia-Antipolis, Valbonne, France; 13. Molecular Neuropsychiatry & Development (MiND) Lab, Campbell Family Mental Health Research Institute, Centre for Addiction and Mental Health, Toronto, Canada; 14. Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Canada; 15. Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; 16. Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; 17. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France; 18. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France; 19. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France

Synapse development and neuronal activity represent fundamental processes for the establishment of cognitive function and communication. Structural organization as well as signaling pathways from receptor stimulation to gene expression regulation are mediated by synaptic activity and are deregulated by neurodevelopmental disorders. Mutations in the *PTCHD1* (Patched domain containing 1) gene have been described in patients with intellectual disability and/or autism spectrum disorder. Here we report that its genetic deletion in *Ptchd1*<sup>-/-</sup> mice affects synaptic transcriptome abundance and impairs synaptic structure and activity, leading to cognitive dysfunction, motor disabilities and hyperactivity. We characterized a PDZ-binding motif at the C-terminal end of PTCHD1 that binds to the postsynaptic proteins PSD95, SAP102, and RACK1. PTCHD1 was unable to rescue the canonical Sonic Hedgehog (SHH) pathway in mouse embryonic fibroblasts depleted of the SHH receptor Patched (PTCH1). In conclusion, we demonstrate that PTCHD1 represents a novel neuronal pathway, directly associated with postsynaptic signaling complexes, that controls the functional organization of excitatory synapses in the developing brain.

Thème : neurodevelopmental disorder and synapse biology

Mots clés : Autism spectrum disorder, intellectual disability, *Ptchd1*, knock-out mouse model, synapse.

## **Radiations ultraviolettes et cancers de la peau : un rôle pour les UVA?**

Evelyne SAGE

Institut Curie, CNRS UMR3347, Orsay

Les radiations ultraviolettes (UV) solaires qui atteignent la surface de la Terre et notre peau sont composées à 95-98% d'UVA (320-400 nm) et 2 à 5% d'UVB (280-320 nm), les UVB les plus courts et les UVC étant absorbés par la couche d'ozone. S'il est bien établi que les UVB laissent dans nos génomes une empreinte mutationnelle typique, que l'on retrouve dans les cancers de la peau, la contribution des UVA à la mutagenèse solaire et la cancérogenèse cutanée n'est pas élucidée. Les UVA contribuent aux photodermatoses et au vieillissement de la peau. Les UVA induisent la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules, générant ainsi un stress oxydant. Les UVA endommagent l'ADN, les protéines, les lipides, et engendrent des réponses cellulaires complexes. Nous avons contribué à établir que les dimères de pyrimidine et la 8oxoguanine sont les deux types de dommages de l'ADN majoritairement produits chez l'Homme, que, *via* les ROS, ils affectent divers paramètres de la réplication de l'ADN et la ralentissent, qu'ils induisent des oxydations et modifications importantes de protéines. Ces événements peuvent impacter le devenir des cellules au niveau de la peau. Si les UVA sont assez faiblement mutagènes du fait de leur faible absorption par l'ADN, ils possèdent la même signature mutagène que les UVB. Ils ont été déclarés cancérogènes chez l'Homme par l'IARC, tout comme les sources équipant les cabines de bronzage (émettant plus de 99% d'UVA). Des études épidémiologiques récentes montrent un lien entre un usage intensif de ces cabines dans le jeune âge et l'incidence de mélanomes. Collectivement, toutes ces observations ont un impact en terme de photoprotection en santé publique.

Thème : Photobiologie

Mots clés : radiations ultraviolettes solaires – dommages de l'ADN – réparation de l'ADN – mutations UV-induites – cancers de la peau

## **Approches transcriptomiques : outils informatiques pour des problèmes biologiques**

Franziska Liesecke, Marc Clastre, Sébastien Besseau, Audrey Oudin, Gaëlle Glévarec, Arnaud Lanoue, Nicolas Papon, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Benoit St-Pierre, Vincent Courdavault, Thomas Dugé de Bernonville

Université François-Rabelais de Tours, EA2106 "Biomolécules et Biotechnologies Végétales", Tours, France avec l'appui du Centre de Calcul Scientifique en Région Centre (CCSC), Fédération CaSciModot.

Un transcriptome correspond à l'ensemble des gènes d'un génome d'un organisme exprimés ensemble dans une condition donnée, en constituant donc une version dynamique. L'étude des transcriptomes d'un organisme offre donc la possibilité de capturer les relations entre transcrits (produits de l'expression des gènes) tout particulièrement en analysant la manière dont ils sont corrélés entre eux. Des gènes codant des enzymes impliquées dans une même voie biologique seront très vraisemblablement exprimés ensemble et dans les mêmes conditions, rendant leurs transcrits fortement corrélés. Ces relations entre transcrits peuvent être notamment visualisées à l'aide de réseaux de co-expression. Le pré-requis à ces analyses est bien entendu la disponibilité de données d'expression de gènes. La libre disponibilité en ligne d'un nombre de plus en plus important de ces données offre maintenant la possibilité de méta-analyses basées sur leurs réutilisations. Cette présentation est dédiée aux approches informatiques menées à l'EA2106 utilisées dans la méta-analyse de données transcriptomiques pour appréhender le fonctionnement de voies de biosynthèse et de signalisation chez les organismes vivants et plus particulièrement les plantes.

Thème : Biologie moléculaire, biologie et physiologie, bioinformatique

Mots clés : Microarrays, RNA-seq, transcriptomique, réseaux de co-expression, traitement de larges données

## Recherche d'alternatives naturelles aux antioxydants

### projet NaturACTIV

#### Contrat Région Centre-Val de Loire

Emilie Leclerc<sup>1,2</sup>, Joel Doussot<sup>1,2</sup>, Valérie Serrano<sup>3</sup>, Jean Raymond Vannier<sup>4</sup>, Jean Marc Seigneuret<sup>3</sup>, Daniel Auguin<sup>1,2</sup>, Eric Lainé<sup>1,2</sup>, Chantal Pichon<sup>5,2</sup>, Eric Lesellier<sup>6,2</sup>, Christophe Hano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, EA 1207, Université d'Orléans, France, <sup>2</sup> Bioactifs et Cosmétiques, GDR 3711 COSMACTIFS, CNRS – Université d'Orléans, France, <sup>3</sup> Alban Muller International, <sup>4</sup> PMA28, Plantes Médicinales et Aromatiques 28, <sup>5</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS Orléans, France, <sup>6</sup> Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UMR7311, CNRS-Université d'Orléans, France

Avec la mise en œuvre de nouvelles réglementations telles que REACH, des ingrédients entrant dans la composition actuelle des crèmes dermocosmétiques risquent de ne plus pouvoir être utilisés. Une adaptation de la plupart des produits cosmétiques actuellement sur le marché est donc nécessaire. Parmi les molécules suscitant actuellement le plus de controverses nous retrouvons les tristement célèbres parabènes utilisés dans les produits cosmétiques ou alimentaires en tant qu'agents antimicrobiens mais aussi les moins connus du grand public antioxydants synthétiques (BHA, BHT, gallates) largement utilisés comme conservateurs et qui présentent une forte toxicité pour les organismes et devront à terme être remplacés.

L'objectif du programme Natur'ACTIV est de valoriser des substances naturelles de plantes cultivées localement en tant qu'antioxydants, conservateurs naturels voire en tant que substances actives pour lutter contre le stress oxydant cutané et ralentir le phénomène de vieillissement des tissus. Ce projet réunit trois laboratoires académiques de l'Université et du CNRS d'Orléans (LBLGC EA1207, CBM UPR4301, et ICOA UMR7311) et deux partenaires industriels (PMA28 et Alban Muller International) et bénéficie du soutien de la Région Centre. Dans le cadre de ce projet, l'objectif est de proposer des produits naturels, éco-conçus, écoresponsables et innovants, à forte valeur ajoutée. Un challenge à relever pour les prochaines années afin de mettre au point les ingrédients de demain d'origine naturelle qui remplaceront les matières premières issues de ressources non renouvelables. Dans un contexte de remise en cause des antioxydants les plus efficaces de l'industrie cosmétique, nous souhaitons nous investir dans le cadre de ce projet dans la mise au point d'ingrédients d'origine végétale permettant de formuler des produits cosmétiques dépourvus d'antioxydants synthétiques mais aussi de développer des antioxydants de la peau présentant des propriétés anti-âge.

Thème : Présentation projet Région Centre Val de Loire, Natur'ACTIV

Mots clés : Antioxydants naturels, Cosmétique, Plantes, Sourcing local

## McSAF :

### « Chemical Tools for Bioconjugation and Biodrugs »



David BONNAFOUS

Directeur des Opérations

1 rue Claude Thion 37000 Tours

Spin-Off d'une équipe de l'Université François Rabelais (Tours), McSAF est une jeune CRO, spécialisée en Chimie Bio-Organique et Chimie des Bio-Conjugués, et se veut être le partenaire privilégié des Industries de Biologie Santé afin de répondre à leurs besoins spécifiques, en synthèse et modification chimique de biomédicaments à façon. Son champ d'expertise couvre à la fois les Peptides & Protéines Thérapeutiques, mais aussi les Anticorps et plus spécifiquement les conjugués Anticorps (Antibody-Drug Conjugate ou ADCs) pour lesquels une approche originale de bioconjugaison via une synthèse sélective a été brevetée (licence exclusive avec l'Université de Tours).

McSAF envisage de cibler les principaux marchés suivants : (1) l'industrie Pharmaceutique & Biopharmaceutique, (2) l'industrie Vétérinaire, ainsi que les (3) industries du Diagnostic/Imagerie.

En terme de modèle économique, McSAF ambitionne de mener de front deux activités : (1) une activité de Recherche sous Contrat (CRO) en synthèse à façon et modification sélective de biomolécules, et (2) une activité de R&D propre, laquelle doit permettre d'étendre les services proposés, et d'accéder potentiellement à de nouveaux marchés.

Thème : Biomédicaments

Mots clés : Chimie de synthèse- Bioconjugaison-ADC-Chemical Biology

## **Étude des propriétés génétiques et fonctionnelles des variants du virus de l'hépatite C lors d'un événement de transmission**

Thibault Guinoiseau \*, Alain Moreau \*, Nicole Ngo-Giang-Huong †, Patrick Vourc'h ‡§, Alain Goudeau\*  
Catherine Gaudy-Graffin \*

From the INSERM U966, Université François Rabelais and CHRU de Tours, \* Tours, France ; Unité Mixte Internationale 174, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), † Chiang Mai, Thailand ; UMR INSERM U930, Université François Rabelais, ‡ Tours, France ; PST ASB, Université François Rabelais, § Tours, France

Chaque année, 3 à 4 millions de personnes dans le monde sont nouvellement infectées par le virus de l'hépatite C (VHC). Chez un individu infecté, le virus circule sous la forme d'une population de variants dont le génome diffère de quelques nucléotides. Les glycoprotéines d'enveloppe (E1E2) constituent la région la plus variable du virus et sont impliquées dans l'entrée des virions dans la cellule. Lors de la transmission du virus, un effondrement de la diversité chez l'individu nouvellement infecté est souvent observé. Les propriétés génétiques et fonctionnelles des variants transmis restent encore mal comprises. L'objectif de cette étude est d'identifier si des déterminants moléculaires des glycoprotéines d'enveloppe du VHC sont associés à une plus grande capacité de transmission. De plus, la sensibilité à la neutralisation autologue des variants transmis ou non sera testée. Les échantillons étudiés proviennent de 5 couples mère-enfant infectés chroniquement par le VHC issus d'un essai clinique réalisé en Thaïlande. Les variants viraux ont été isolés pour chaque individu par la méthode d'amplification de génome unique (SGA) et séquencés avec la technologie MiSeq (kit Nextera® XT, Illumina). Les séquences ont été analysées sur la plate-forme Galaxy Biomina permettant un assemblage de novo avec le logiciel Trinity. Une analyse de la variation nucléotidique par position a été effectuée pour sélectionner les amplicons issus d'un génome unique. La SGA et le séquençage ont été réalisés pour 3 paires mère-enfant. Pour la 1ère, 28 séquences de clones ont été isolées pour la mère, 30 pour l'enfant ; pour la 2ème, 24 pour la mère, 29 pour l'enfant ; pour la 3ème, 17 pour la mère et 26 pour l'enfant. Pour les 3 paires, une chute de la diversité génétique chez l'enfant a été observée. Le variant majoritaire chez la mère est retrouvé majoritaire chez l'enfant pour 2 paires. Après clonage des gènes E1E2 correspondant aux variants d'intérêts, des tests d'infectivité sur cellules hépatocytaires ainsi que des tests de neutralisation par le sérum maternel sont réalisés. Les résultats préliminaires pour la 1ère paire montrent que seul un variant chez la mère et un chez l'enfant sont infectieux avec le système de pseudo-particules utilisé. Ces 2 variants ne diffèrent que d'un seul acide aminé. Ils ont en commun une mutation en position 229 non retrouvée dans les séquences des autres variants. Ces 2 variants sont neutralisés par le sérum autologue. Les mêmes expériences seront à réaliser sur les 2 autres paires et seront présentées. Au final, les résultats de cette étude pourront aider à mieux comprendre les étapes précoces de l'infection par le VHC pour mieux appréhender les approches immunoprophylactiques ou vaccinales.

## **Modulation des fonctions des cellules dendritiques par des anticorps bispécifiques ciblant les récepteurs de l'immunité innée**

L. Lamendour<sup>1</sup>, N. Deluce<sup>1,3</sup>, T. Laboute<sup>1</sup>, A. Héraud<sup>1</sup>, A. Di Tommaso<sup>2</sup>, N. Aubrey<sup>2</sup>, M. Ayoub<sup>4</sup> et F. Velge-Roussel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University François-Rabelais, EA4245, Tours, France

<sup>2</sup> University François-Rabelais, UMR INRA1282 Tours, France

<sup>3</sup> EFS Centre Atlantique, Tours, France

<sup>4</sup> University François Rabelais, INRA UMR 85, CNRS UMR 7247; Nouzilly, France

**Introduction :** Les cellules dendritiques ont une place centrale dans l'immunité, car elles peuvent induire une immunité spécifique ou une tolérance immune. L'obtention de tolérance immune est un des objectifs de l'EA 4245 qui travaille sur la greffe d'organe. Les pathogènes utilisent les récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRRs) à la surface des DCs pour induire de l'immunotolérance dans une stratégie de subversion. Un des mécanismes majeurs est l'induction d'IL-10 par les DCs, une cytokine régulatrice induisant la tolérance immune. Chez l'homme ; il existe différentes populations de DCs qui ont des compétences différentes et expriment de manière variable les différents PRRs. L'objectif du projet est l'induction de la sécrétion d'IL-10 par les DCs en mimant cette stratégie, au travers de l'activation des PRRs par des anticorps modulateurs.

**Matériel et méthodes :** Effet d'un anticorps bispécifique (scFvs en tandem) construit à partir d'une banque d'anticorps anti-PRRs sur des DCs dérivées de monocytes (moDCs), sélectionné sur la sécrétion d'IL-10 et la liaison aux moDCs. Mesure de l'effet au niveau phénotypique, au niveau fonctionnel sur les DCs et analyse de la mécanistique du tandem par technologie BRET sur des HEKs transfectées.

**Résultats :** Le tandem sélectionné induit une maturation des moDCs et une synthèse d'IL-10 dose dépendante avec peu d'IFN $\gamma$  et d'IL-12p70. De plus, nous avons mis en évidence la liaison du tandem à la surface des DCs de manière dose et température dépendant. Cette liaison est réversible en présence des scFvs compétiteurs ; mais également inhibée en présence de cytochalasine D, montrant le rôle de la fluidité membranaire dans ce phénomène. Nous avons mesuré une activation de la voie P-Syk (voie de transduction connue des PRRs) sous l'action du tandem. L'action du tandem par technologie BRET montre un phénomène spécifique, temps et dose dépendant, très rapide et réversible par compétition avec les scFv compétiteurs. L'induction de lymphocytes T régulateurs qui sont les éléments principaux d'une tolérance immune par les DCs traitées par tandem est en cours d'analyse.

## **Caractérisation d'un transporteur ABC de zinc chez *Streptococcus agalactiae***

Pauline Moulin<sup>1</sup>, Camille Cano<sup>1</sup>, Laurent Mereghetti<sup>1,2</sup>, Agnès Rosenau<sup>1,2</sup>, Aurélia Hiron<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ISP, Université Tours, INRA, UMR1282, F-37032 Tours, France

<sup>2</sup> CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie et Hygiène Hospitalière, F-37044 Tours, France

*Streptococcus agalactiae* est une bactérie commensale des tractus intestinal et génital humain qui représente en France une des premières causes d'infections materno-fœtales. Parmi les facteurs de virulence de la bactérie décrits, l'équipe s'est intéressée plus particulièrement à la lipoprotéine Lmb qui a été décrite comme une adhésine se liant à un composant de la matrice extracellulaire, la laminine.

Dans cette étude nous avons mis en évidence un nouveau rôle de cette protéine dans le transport du zinc. Nous avons montré que la protéine Lmb fait partie d'un transporteur ABC de zinc formé du complexe perméase/ATPase avec les protéines AdcB et AdcC respectivement, des zincophores Sht et ShtII ainsi que de deux homologues de la protéine Lmb, AdcA et AdcAll. Comme de nombreux ions métalliques, le zinc est un élément essentiel pour la plupart des micro-organismes, en servant notamment de cofacteur aux métalloenzymes ou aux protéines à doigts de zinc.

L'étude de la croissance des différents mutants pour les gènes codant ce transporteur en milieu chimiquement défini carencé en zinc nous a permis de montrer l'importance de ce transporteur pour assurer une croissance normale de la bactérie. Ce suivi de croissance a également mis en évidence une redondance fonctionnelle entre les protéines Lmb/AdcA/AdcAll et Sht/ShtII dans le transport du zinc. De plus l'analyse microscopique de ces mutants a montré que l'absence de ce transporteur affecte la morphologie cellulaire de la bactérie. Enfin, des expériences de compétition bactérienne entre la souche sauvage et ces mutants ont montré que ce transporteur assure la survie de la bactérie en milieux biologiques humains comme le liquide amniotique et le liquide céphalo-rachidien où la bactérie est retrouvée lors d'infection à *S. agalactiae*. Dans cette étude nous avons également mis en évidence, un deuxième rôle des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément. En effet, des expériences de survie des souches  $\Delta$ sht,  $\Delta$ shtII et  $\Delta$ sht $\Delta$ shtII dans du sang humain total ou décomplémenté nous ont permis de montrer une redondance fonctionnelle de ces protéines dans la résistance au complément. Actuellement des expériences sont en cours pour savoir si un lien existe entre les deux rôles observés des protéines Sht et ShtII à savoir dans le transport du zinc et la résistance au complément.

L'étude de ce transporteur ABC de zinc a donc permis de montrer que le zinc est essentiel au métabolisme de *S. agalactiae* et que son import est principalement assuré par ce transporteur.

Thème : Transport de zinc chez *Streptococcus agalactiae*

Mots-clés : *Streptococcus agalactiae*, protéine Lmb, transport de zinc

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## De la programmation moléculaire aux traitements ciblés des cancers

Sébastien Papot, Brigitte Renoux, Isabelle Opalinski, Mikaël Thomas, Antony Fernandes, Marion Grinda, Thibaut Legigan, Romain Barat, Jérôme Alsarraf

Université de Poitiers, UMR 7285 (IC2MP), groupe "Systèmes Moléculaires Programmés" Poitiers.

Site internet : [www.smp.labo.univ-poitiers.fr](http://www.smp.labo.univ-poitiers.fr)

Depuis quelques années, notre équipe de recherche tente de développer des systèmes moléculaires programmés pour mimer, explorer et/ou manipuler le vivant. Afin de fonctionner de façon autonome, ces molécules contiennent un programme chimique inscrit au sein même de leur structure, qui pilote leur comportement en interaction avec les milieux biologiques.

Pour illustrer ce concept, nous avons conçu des systèmes moléculaires dédiés à la vectorisation thérapeutique d'agents anticancéreux. Ces composés sont programmés pour : (1) transporter de puissants agents anticancéreux en toute innocuité pour les tissus sains, (2) reconnaître une spécificité tumorale et (3) libérer la substance active sélectivement au niveau de la tumeur. Ils présentent des éléments de programmation moléculaire tels que des espaceurs auto-immolables, des amplificateurs chimiques, des macrocycles coulissants ou auto-ouvrants...<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Quelques exemples : (a) R. Barat, T. Legigan, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, P. Poinot, A. E. Fernandes, V. Aucagne, D. A. Leigh and S. Papot *Chem. Sci.* **2015**, 6, 2608-2613; (b) J. Alsarraf, E. Péraudeau, P. Poinot, I. Tranoy-Opalinski, J. Clarhaut, B. Renoux and S. Papot *Chem. Commun.* **2015**, 51, 15792-15795; (c) T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel and S. Papot *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11606-11610; (d) T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, J.-M. Berjeaud, F. Guilhot and S. Papot *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4516-4520; (e) A. Fernandes, A. Viterisi, F. Coutrot, S. Potok, D. A. Leigh, V. Aucagne, and S. Papot *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6443-6447.

Thème : Vectorisation thérapeutique et ciblage tumoral

Mots clés : programmation moléculaire, cancer, microenvironnement tumoral

## Sucres et Soufre : un bon mélange pour la biocatalyse

Richard DANIELLOU

ICOA UMR CNRS 7311, Université d'Orléans

Carbohydrates play an important part in a vast array of biological processes and therefore glycomimetics are currently becoming a powerful class of novel therapeutics. Amongst them, thioglycosides, in which a sulfur atom has replaced the glycosidic oxygen atom, are tolerated by most biological systems. Their major advantages rely in the fact that they adopt similar conformations than the corresponding O-glycosides and especially that they prove to be less sensitive to acid/base or enzyme-mediated hydrolysis. Such compounds have already demonstrated to be valuable tools as good chemical donors for synthetic purposes, as stable intermediates in X-ray crystallographic analysis of proteins and, of particular interest, as competitive inhibitors of a wide range of glycosidases involved in numerous diseases. Besides the synthetic methodologies developed throughout the years by organic chemists, the presence of natural S-glycoconjugates was recently assessed and lead to the discovery of some glycosyltransferases involved in such rare biocatalytic processes. In parallel, the increases of knowledge on the mechanism and the structure of glycoside hydrolases have conducted to the development of original catalysts with greatly improved synthetic properties for thioglycosidic linkages. However biocatalyzed procedures of thioglycosylation still represent an emerging area.

Herein, we will discuss our recent findings in this tremendous field. Firstly we will show our results dealing with the glycosyltransferase S-UGT74B1 from *Arabidopsis thaliana* and demonstrate its ability to promote the synthesis of various desulfoglucosinolates. Then, a small library of mutants of glycoside hydrolases from *Dictyoglomus thermophilum* will be used to demonstrate their ability to prepare the S-glucosylated thiotyrosine. In addition, comparisons of the tridimensional structures and the mechanisms of these original enzymes will open us powerful synthetic perspectives.

Thème : Enzymologie, Glycobiologie, Chimie Organique

Mots clés : Glycosidases, Glycosyltransférases, Thioglycosides.

# Conservation des gamètes mâles dans l'oviducte de poule

## projet OVISPERM

### Contrat Région Centre-Val de Loire

Nadine GÉRARD<sup>1</sup>, Cindy RIOU<sup>1,2</sup>, Aurélien BRIONNE<sup>4</sup>, Luiz CORDEIRO<sup>1,3</sup>, Joel DELAVEAU<sup>5</sup>, Xavier DRUART<sup>1</sup>, Audrey GARGAROS<sup>1</sup>, Joël GAUTRON<sup>4</sup>, Grégoire HARICHAUX<sup>1</sup>, Valérie LABAS<sup>1</sup>, Céleste LEBOURHIS<sup>5</sup>, Frédéric MERCERAND<sup>5</sup>, Lydie NADAL-DESBARATS<sup>6</sup>, Virginie PLACIDE<sup>7</sup>, Stéphane PETOUD<sup>7</sup>, Karine REYNAUD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, F-37380 Nouzilly, <sup>2</sup> ALLICE, Station de phénotypage, F-37380 Nouzilly, <sup>3</sup> Semi-arid Federal University, Brasil, <sup>4</sup> URA, INRA, F-37380 Nouzilly, <sup>5</sup> UEPEAT, INRA, F-37380 Nouzilly, <sup>6</sup> RMN, PPF ASB, Université de Tours, F-37032 Tours, <sup>7</sup> CBM, CNRS, F-45071 Orléans

Chez la majorité des espèces animales, la survie des spermatozoïdes (SPZ) déposés dans l'appareil reproducteur de la femelle au cours de l'accouplement est très brève, ce qui limite l'utilisation optimale des femelles en condition d'élevage, et peut avoir des incidences majeures sur la survie des espèces en conditions naturelles. Cependant chez les oiseaux, les SPZ peuvent être stockés plusieurs semaines dans les glandes utéro-vaginales (SST ; poules : 3 semaines ; dinde : 2 mois). Dans ce projet notre objectif était, au niveau fondamental, de comprendre les mécanismes biologiques qui permettent cette survie, et au niveau appliqué, d'identifier les composés sécrétés par la femelle qui assurent la survie des SPZ pour concevoir des milieux de conservation cellulaire optimisés. Notre travail s'est basé sur la comparaison de deux lignées dont la durée de survie des SPZ dans l'oviducte est très différente (DPF- 13 jours ; DPF+ 21 jours). Les fluides d'oviductes et les SST ont été collectés et analysés par spectrométrie de masse à haute résolution (SM-HR ; protéomique) de type Orbitrap et par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN, <sup>1</sup>H ; biochimique) afin d'identifier des biomarqueurs de la durée de ponte fertile. 922 et 1044 protéines ont été identifiées dans le fluide et dans les SST respectivement, dont 415 sont communes. L'analyse bio-informatique a précisé la localisation et la fonction moléculaire de chacune. La comparaison DPF-/DPF+ avant et après insémination (IA) a montré l'incidence génétique sur le protéome. De même, l'analyse en RMN a différencié les deux lignées et montré l'évolution métabolomique différentielle après IA. Pour étudier le stockage des SPZ, nous avons néosynthétisé des senseurs fluorescents pour marquer les spermatozoïdes et les suivre en imagerie optique (PAMAM-G3-NB-Eu(III), -Yb(III)). En conclusion, le financement a permis d'établir des partenariats enrichissants, dynamiques et fructueux, d'obtenir des résultats prometteurs et valorisables à moyen terme, et de consolider nos connaissances en physiologie de la reproduction. Le conseil scientifique de la Région Centre est très sincèrement remercié.

Thème : Physiologie de Reproduction

Mots clés : Spermatozoïde, oviducte, Sperm storage tubules, Poule

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## **Présentation du Centre de formation Bio<sup>3</sup>Institute**

Audrey MUNOS

Groupe IMT, Tours

## La physioxie : un paramètre essentiel dans la régulation de la mélanogénèse

Shalina HASSANALY, Alexia PERRIN, Fabienne FASANI, Claudine KIEDA, Catherine GRILLON

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR 4301, ORLEANS, France

Dans la peau, le microenvironnement, et plus particulièrement le taux d'oxygène, joue un rôle majeur dans l'homéostasie. Ainsi, la pression partielle en oxygène dans la peau appelée physioxie ( $pO_2 \sim 3\%$ ) est considérablement inférieure à celle de l'atmosphère (normoxie ;  $pO_2 \sim 21\%$ ).

Dans le cadre des réglementations actuelles visant à remplacer les tests effectués sur animaux, les ingrédients dermocosmétiques sont testés *in vitro*, sur culture cellulaire. Or, ces tests sont effectués à des pressions partielles en oxygène correspondant aux conditions atmosphériques (normoxie), qui ne sont pas physiologiques. Lors de plusieurs études, notre équipe a montré que l'expression et l'activité de régulateurs cruciaux, tels que les microARN, dépendaient de la pression partielle en oxygène utilisée lors des cultures cellulaires (Carreau et al., 2011 ; Grillon et al., 2012 ; Nadim et al., 2015).

Actuellement, le contrôle de la pigmentation cutanée est un enjeu majeur dans le secteur dermocosmétique, à des fins esthétiques mais également dans le domaine médical. Afin de pouvoir réguler efficacement la synthèse de mélanine, ou mélanogénèse, il est nécessaire d'en avoir une bonne compréhension. Dans cette optique, il est important d'étudier ce processus complexe *in vitro* dans les conditions les plus proches de la physiologie cutanée.

Nous avons étudié des mélanocytes humains en culture en condition de normoxie et de physioxie. Nous montrons ici que la mélanogénèse est modulée par le taux d'oxygène aux différentes étapes du processus. L'expression des molécules clés, telles que le facteur de transcription MITF, les enzymes TRP1, TRP2 et tyrosinase, est régulée à la fois au niveau ARN messagers et protéines. Les quantités de mélanine synthétisée et sécrétée diffèrent en physioxie par rapport à la normoxie.

Ces résultats montrent l'importance de se placer en physioxie lors de l'étude de la mélanogénèse *in vitro* afin de se rapprocher des conditions physiologiques cutanées, notamment en ce qui concerne l'évaluation de l'efficacité de composés agissant sur la pigmentation de la peau.

Mots-clés : Pigmentation, Mélanogénèse, Physioxie, Culture cellulaire, Cosmétique

Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016

## Développement de GAINS 1.0 :

### Greenpharma Automated Identification of Natural Structures

Glorianne JOURAVEL<sup>1,2</sup>, Sylvain BLONDEAU<sup>1</sup>, Cyril COLAS<sup>2,3</sup>, Emilie DESTANDAU<sup>2</sup>, Quoc-Tuan DO<sup>1</sup>, Philippe BERNARD<sup>1</sup>, Claire ELFAKIR<sup>2</sup>, Franck HIMBERT<sup>1</sup>

1 : GREENPHARMA SAS, 3 allée du TITANE, 45100 ORLEANS

2 : Université d'Orléans, CNRS, ICOA, UMR7311, rue de Chartres, F-45067, Orléans, France

3 : Université d'Orléans, CNRS, CBM, UPR 4301, F-45071, Orléans, France

La nature détient de multiples ressources que la science tend à approcher et sublimer. La caractérisation la plus fine et exhaustive possible des constituants des matières naturelles, notamment végétales, demeure un défi majeur en phytochimie. En effet, un extrait de plante contient entre des dizaines et des milliers de composés. Afin de décrire ce contenu moléculaire, une séparation efficace et une détection adaptée sont nécessaires. La chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-HRMS/MS) est une des méthodes clés pour atteindre ce but. Néanmoins, cela génère de nombreuses données pour lesquelles le retraitement manuel est long, laborieux et pas aussi efficace qu'une exploration automatisée des données.

GAINS est un outil qui permet de traiter les données UHPLC-HRMS/MS de manière rapide, automatique et spécifique des molécules naturelles. Un échantillon est analysé par UHPLC-ESI-HRMS. Les données de spectrométrie de masse acquises en modes d'ionisation positif et négatif sont traitées par des algorithmes permettant la détermination automatique de la masse monoisotopique de chaque composé détecté. A cette étape, un filtre est nécessaire pour trier les hypothèses multiples obtenues pour un pic chromatographique. Ensuite, la base de données Greenpharma, qui regroupe environ 150 000 entrées de composés naturels, est interrogée via un critère de masse exacte afin d'obtenir une liste de candidats pour chaque pic. Pour classer les candidats, une dernière étape consiste à comparer les données expérimentales de fragmentation avec les spectres de fragmentation des structures de candidats générés *in silico*. La finalité du processus est d'identifier la majorité des composés présents dans l'extrait de plante étudié en proposant des structures.

Des étapes de validation ont été conduites en utilisant un large set de standards naturels. Le set a été analysé pour évaluer les performances du traitement automatique. Plus le nombre de molécules du set retrouvées est important, plus l'outil fonctionne de façon satisfaisante. Les résultats de recouvrement ont atteint un bon niveau après optimisations. Tout en restant dans la lignée de travaux actuels en métabolomique, l'innovation de cette approche réside dans sa spécificité envers les produits naturels ainsi que sur la combinaison efficace de traitements informatiques.

Thème : Analyse phytochimique et traitement des données automatisé

Mots-clés : Composés naturels, Contenu moléculaire, Identification, Spectrométrie de masse, Métabolomique

## **LuWRKY36, a flax (*L. usitatissimum* L.) transcription factor, is involved in the regulation of lignan synthesis in response to a fungal elicitor**

Lucija Markulin, Cyrielle Corbin, Éric Lainé, Christophe Hano

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC) EA1207, Pôle Universitaire d'Eure et Loir, Chartres, FRANCE

The main flaxseed (*L. usitatissimum* L) lignan is secoisolariciresinol accumulated at high level in the seedcoat. Its biosynthetic pathway is well characterized : after the dimerization of coniferyl alcohol, the first enzyme acting is a pinoresinol-lariciresinol reductase (LuPLR1) which performs two reduction steps leading to the synthesis of (+)-secoisolariciresinol from (+)-pinoresinol. The expression of LuPLR1 in response to *Fusarium oxysporum*, a flax's fungal pathogen, has been shown earlier but the signal transduction was still to elucidate.

Promoter sequence analysis of LuPLR1 showed three W boxes, putative binding sites for WRKY transcription factor family. Using degenerated primers we obtained putative the transcription factor, LuWRKY36.

Expression profile analysis showed LuWRKY36 gene expression in roots, stem, leaves and increase in expression during seed development. Our study demonstrated an increase of the expression of LuWRKY36 and LuPLR1 genes in response to *Fusarium* elicitation as well as an increase in (+) secoisolariciresinol quantity. Time and intensity vary between fungal resistant (Baikal) and fungal sensitive flax's cultivar (Barbara). We also demonstrated that LuWRKY36 and LuPLR1 gene expression as well as (+) secoisolariciresinol biosynthesis are up regulated by ABA (abscisic acid) and down regulated by ethylene. DNA–protein binding experiments showed that LuWRKY36 binds W box 3 found in LuPLR1 gene promoter. W box 3 is preferentially bound by LuWRKY36 N terminal DNA binding domain.

Altogether these results suggest that the reaction of flax to *Fusarium* elicitation is different (in timing and intensity) between tolerant and sensitive cultivars, and that this difference could be part of the cause for this difference of sensitivity. Triggering of the LuPLR1 gene expression (and thus of the lignan synthesis) appears mediated by ABA and involves the LuWRKY36 transcription factor which probably interacts with the W box 3 of the LuPLR1 promoter through its N terminal WRKY domain.

## **Transfert du bénéfice associé à un entraînement exécutif sur les performances en mémoire épisodique chez des adultes âgés**

Lucile Burger<sup>1</sup>, Séverine Fay<sup>1</sup>, Pierrich Plusquellec<sup>2</sup>, & Laurence Taconnat<sup>1</sup>

1 Université François-Rabelais, Tours, France, Université de Poitiers, France et UMR 7295 « Centre de Recherches sur la Cognition et l'Apprentissage », CNRS ; lucile.burger@etu.univ-tours.fr

2 Centre for Studies on Human Stress, Research Center of the Mental Health Institute, Montreal, Quebec, Canada Etholabs, Ecole de psychoéducation, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Le déficit de mémoire observé dans le vieillissement s'explique largement par un déficit d'utilisation de stratégies de mémoire appropriées associé à un déficit exécutif et. Comparés aux adultes jeunes, non seulement, les adultes âgés initient spontanément moins de stratégies, mais les stratégies utilisées ne sont pas les plus efficaces (comme l'imagerie mentale ou la production de phrases) car celles-ci sont coûteuses en contrôle exécutif. Dans cette étude, nous avons entraîné les fonctions exécutives qui interviennent en amont de la mémorisation pour en observer les effets sur la mémoire et l'utilisation de différentes stratégies à l'encodage chez des adultes âgés. 34 adultes âgés ont été évalués lors du pré-test sur des épreuves exécutives et une tâche d'apprentissage de paires de mots suivi d'un rappel indicé. La stratégie mise en place pour apprendre chaque paire de mots a été relevée. Deux groupes ont alors été formés, l'un (n = 17) a été soumis à 10 sessions d'entraînement des fonctions exécutives (tests créés pour l'expérience) deux fois par semaine pendant une heure tandis que l'autre groupe « contrôle » (n = 17) effectuait 10 séances sans stimulation cognitive. En post-test, le même type d'évaluation qu'au pré-test a été effectué dans les deux groupes. Nos résultats ont montré qu'en pré-test, les deux groupes d'adultes âgés présentaient les mêmes profils cognitifs, alors qu'en post-test seul le groupe entraîné présentait à la fois une amélioration des performances exécutives et des performances de mémoire (augmentation de l'utilisation de stratégies d'encodage efficace et du nombre de mots rappelés appris avec ces stratégies efficaces). L'entraînement des fonctions exécutives améliore les performances à des tests exécutifs, à un test de mémoire, ainsi que l'utilisation de stratégies efficaces. Cette étude montre pour la première fois des effets de transfert de l'entraînement exécutif à la mémoire épisodique (effet de transfert éloigné). Nos résultats pourraient avoir des retombées très importantes dans une perspective de remédiation cognitive.

Thème : mémoire et entraînement cognitif

Mots clés : stratégies ; mémoire épisodique; entraînement exécutif ; transfert ; adultes âgés.

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## **Inhibition des ADN glycosylases, enzymes initiant le système de réparation de l'ADN par excision de base et nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancer**

Charlotte Rieux<sup>a</sup>, Franck Coste<sup>a</sup>, Stéphane Goffinont<sup>a</sup>, Françoise Culard<sup>a</sup>, Stéphane Bourg<sup>a,b</sup>, Zahira Tber<sup>b</sup>, Vincent Roy<sup>b</sup>, Luigi Agrofoglio<sup>b</sup>, Bertrand Castaing<sup>a</sup> et Norbert Garnier<sup>a</sup>

a Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301, CNRS, rue Charles Sadron, 45701 Orléans Cedex 2, France.

b Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, CNRS, UMR 7311, Rue de Chartres, 45067 Orléans Cedex 2, France.

La structure de l'ADN, porteur de l'information génétique de tout organisme vivant, subit constamment des modifications par des facteurs endogènes et environnementaux dont les effets sont génotoxiques[1]. Les ADN glycosylases sont les protéines initiatrices du système de réparation de l'ADN par excision de base (BER), un des mécanismes mis en place par les organismes pour contrecarrer les effets délétères des lésions de l'ADN (mutations, carcinogénèse et vieillissement) et ainsi survivre[2]. Quelques traitements anti-cancer, tels que les radiations ionisantes et les agents alkylants, ont pour but d'endommager l'ADN des cellules cancéreuses. Dans ce contexte le BER peut permettre aux cellules ciblées d'échapper aux traitements. Les ADN glycosylases sont donc de potentielles cibles thérapeutiques anti-cancer intéressantes[3]. Dans le but de concevoir des inhibiteurs des ADN-glycosylases, nous avons utilisé une stratégie d'amarrage moléculaire flexible et aveugle en combinant les techniques de modélisation moléculaire telles que la dynamique moléculaire et le docking aveugle. Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier des sites de fixation de petites molécules, analogues à des nucléobases, connues pour interagir avec les protéines étudiées d'après des données expérimentales [4]. Ces sites de fixation sont en cours d'analyse pour déterminer des points pharmacophoriques, et ainsi optimiser la structure des petites molécules afin d'améliorer leurs interactions avec les protéines étudiées dans l'optique d'une inhibition compétitive.

Thème : modélisation moléculaire

Mots-clés : thérapie anti-cancer, conception d'inhibiteurs des ADN glycosylases, simulation de dynamique moléculaire, amarrage moléculaire, pharmacophore.

# Synthesis & analysis of regiofunctionalized $\beta$ -cyclodextrin derivatives by new pyridine carboxylate ligands towards MRI application

Célia Sappej<sup>1,2</sup>, François Estour<sup>1</sup>, Franck Suzenet<sup>2</sup>, Géraldine Gouhier<sup>1</sup>

1. Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen, France

2. Université d'Orléans, ICOA, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, 45067 Orléans

Magnetic Resonance Imaging is one of the most important and non-invasive tool in clinical diagnostic and biomedical research. [1] Based on the water protons relaxation, this technic exhibits an intrinsic low sensitivity. To improve it, gadolinium complexes can be used as contrast agents. Indeed, due to its paramagnetic properties, gadolinium is suitable for this purpose.

A contrast agent is defined by its ability to accelerate the relaxation of water protons in the surrounding tissues.

This relaxivity depends on five parameters (Figure 1) but it has been shown (2) that only three of them could be changed in order to develop new contrasts products:  $q$  (the

hydration number of the complex),  $k_{ex}$  (the water/proton exchange rate) and  $\tau_R$  (the rotational correlation time of the molecule) parameters. Moreover, the metallic complexes have to be enough stable because of the toxicity of free gadolinium in the organism.

We plan to use cyclodextrins (3) for their supramolecular properties. Their high molecular weight contributes to decrease the rotation rate of the complex, and their numerous hydroxyl groups allows various functionalizations.

The first part of our project consists in developing a gadolinium complex based on the  $\beta$ -cyclodextrin scaffolds **1** and **2**. In order to regioselectively substitute the oligosaccharide, this one was modified according to literature procedures (4) (5). We have developed a methodology to introduce the ligands on the primary face of  $\beta$ -cyclodextrin (Figure 2).

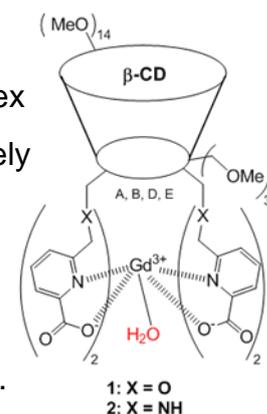
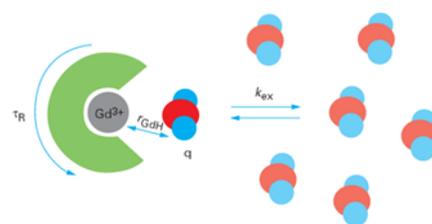
Purification conditions were optimized to isolate the two key intermediates.

Their characterization is in progress.

**Mots clefs:** Cyclodextrin, contrast agents, MRI

**Références :** [1] A. S. Merbach et al, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, 2nd Ed, Wiley, 2013, [2] J-F. Morphin et al, *Agent de contraste pour l'IRM*, Technique de l'ingénieur, 2014, AF6818, [3] V. T. D'Souza et al, *Chem. Rev.*, 1998, 98, 1741-1786, [4] R. Gramage-Doria et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 1554 – 1559, [5] D. Armspach et al, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 2588 – 2592

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*



## **CRISPR-cas9 : de la découverte aux applications biotechnologiques; une véritable révolution**

Philippe Lanotte

Equipe « Bactéries et Risque Materno-Fœtal », ISP, INRA, Université de Tours, UMR 1282, 37380, Nouzilly  
UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Tours  
Service de Bactériologie-Virologie, CHRU de Tours

Le système CRISPRs/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) et les gènes cas associés (cas pour CRISPR-associated)), a été récemment décrit. Une des fonctions principales de ce système, véritable système d'immunité acquise, est de procurer aux bactéries un moyen de lutte contre des infections phagiques et plus généralement contre des acides nucléiques étrangers. Ce système agit par un mécanisme d'ARN interférence proche de celui décrit chez les eucaryotes (Barrangou et al., Science 2007). De telles régions sont retrouvées chez près de 40% des espèces bactériennes et 90% des Archaea (Horvath & Barrangou, Science 2010). La nature des gènes cas présents a permis une classification des différents systèmes CRISPRs/Cas actuellement connus (Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 2015). Trois étapes sont nécessaires pour que le système fonctionne, l'adaptation ou immunisation, l'expression et l'étape d'interférence ou d'immunité. Les protéines codées par les gènes cas participent à ces différentes étapes. Certains systèmes font intervenir des complexes protéiques en particulier pour l'interférence alors que pour les systèmes de type II, c'est la protéine Cas9, qui assume à elle seule, plusieurs fonctions. La reconnaissance de l'ADN étranger porte sur une courte séquence d'un acide nucléique déjà rencontré et intégré dans le locus CRISPR de la bactérie sous la forme d'un spacer. C'est cette séquence « spacer » associée au tracrRNA, une molécule essentielle du système, qui en présence de Cas9 va être à l'origine de la dégradation de cet ADN étranger (Jinek et al., Science, 2012). Ce phénomène naturel est devenu ces dernières années un outil révolutionnaire en biotechnologie puisqu'un tracrRNA chimère peut être utilisé pour inactiver spécifiquement des gènes, modifier ou corriger des gènes, lorsqu'il est associé à une séquence d'ADN d'intérêt avec des applications en particulier pour le « genome editing ». La découverte et les principes de fonctionnement du système CRISPR/Cas ainsi que les principales applications de cette technologie seront abordées.

Mots clés : CRISPR – Cas 9 – Bactéries/phages – Biotechnologie - Genome editing

## L'univers en expansion des virus géants

Chantal Abergel & Jean-Michel Claverie

Information Génomique et Structurale UMR7256, CNRS-AMU, IMM FR3479. Marseille

Depuis leur découverte au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, on a toujours considéré que les virus n'étaient pas retenus par le filtre conçu par Chamberland pour isoler les microbes. C'est en 2003 que la découverte du premier virus géant, Mimivirus, a démontré l'existence de virus visibles au microscope optique, possédant un génome à ADN comparable en complexité à celui des bactéries. Depuis, d'autres virus géants ont été isolés démontrant qu'ils ne sont pas rares mais ont bien été occultés pour des raisons historiques. Alors que l'on commençait à proposer une théorie sur l'origine et l'évolution des virus à ADN, a surgi la découverte d'une nouvelle famille de virus géants, les Pandoravirus. Ces virus, différents par leur morphologie, présentent des génomes de complexité comparable aux plus petites cellules eucaryotes. Plus de 90% des protéines codées par leurs génomes ne ressemblent à rien de connu, suggérant qu'ils pourraient avoir une origine différente des autres virus. C'est finalement en prospectant le pergélisol que nous avons réactivé deux virus géants de plus de 30.000 ans, Pithovirus sibericum, qui bien que partageant la morphologie des Pandoravirus, correspond à une troisième famille de virus, enfin Mollivirus sibericum, de morphologie sphérique et premier membre de la quatrième famille de virus géants. La découverte de 3 nouvelles familles en seulement 3 ans démontre que nous sommes loin d'avoir prospecté la biodiversité virale. Une des surprises apportée par l'analyse des génomes de chacune des nouvelles familles de virus géants a été le nombre de gènes unique à chacune des familles, également absents des bases de données de séquences. On ne peut rien dire de plus du tiers de leurs gènes bien qu'ils soient tous exprimés ils codent donc pour des protéines totalement originales. Cette observation soulève la question de l'origine des virus géants et de leur mode d'évolution. De nombreuses surprises pourraient surgir de l'étude de ces géants et permettre d'élucider le rôle qu'ils ont pu jouer dans l'apparition de la vie sur terre.

Thème : Virologie

Mots clés : Virus géants, Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus, Mollivirus

# Posters

## **Filière A**

### **PA1- Metabolomic screening in a large germplasm collection of grape *Vitis vinifera* L. Insights for the selection of polyphenol-rich varieties**

Kévin Billet, Benjamin Houillé, Thomas Dugé de Bernonville, Guillaume Delanoue, Sébastien Besseau, Audrey Oudin, Vincent Courdavault, Marc Clastre, Laurence Guerin, Nathalie Guivarc'h, Arnaud Lanoue

### **PA2- Analyse métabolomique d'une cohorte d'autistes Libanais**

Tania Bitar, Walid Hleihel, Lydie Nadal-Desbarats, Patrick Emond, Sylvie Mavel, Christian R. Andres

### **PA3- Les fonctions inexplorées du liquide amniotique chez l'oiseau**

Mylène Da Silva, Aurélien Brionne, Valérie Labas, Lucie Combes-Soia, Maryse Mills, Magali Chessé, Yves Nys, Sophie Réhault-Godbert

### **PA4- Impact de l'acclimatation embryonnaire à la chaleur chez le poulet sur des modifications post-traductionnelles des histones**

David Sarah-Anne, Piegu Benoit, Hennequet-Antier Christelle, Boredeau Thierry, Crochet Sabine, Courousse Nathalie, Beauclair Linda, Collin Anne, Coustham Vincent

### **PA5- Genetic manipulation of relevant *Candida*-related species**

Tatiana A. Defosse, Sébastien Besseau, Thomas Dugé de Bernonville, Céline Melin, Arnaud Lanoue, Gaëlle Glévarec, Audrey Oudin, Joël Crèche, Marc Clastre, Vincent Courdavault, Jean-Philippe Bouchara, Nathalie Giglioli-Guivarc'h and Nicolas Papon

### **PA6- Composition en acides gras du tissu adipeux péri-prostatique (TAPP) : association avec l'agressivité tumorale, l'origine ethno-géographique, et la migration des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro***

S. Figiel, G. Fromont, K. Maheo, I. Domingo, R. Guibon, P. Besson, M. Pinault, C. Guimaraes, Bruyère, R. Mathieu, AR. Azzouzi, MA. Perrouin-Verbe, J. Rigaud, P. Blanchet, et L. Multigner

### **PA7- Rôle du canal calcique voltage dépendant CaV1.3 dans la biologie des cellules épithéliales cancéreuses du colon**

Fourbon Y., Guéguinou M., Felix R., Hugen A., Lajoie L., Lecomte T., Fromont G., Chatelier A., Constantin B., Mignen O., Potier-Cartereau M., Chantôme A., Bois P., Vandier C.

### **PA8- Nouveaux inhibiteurs ciblant la protéine Stat5 dans les cellules leucémiques**

Ludovic Juen, Marie Brachet-Botineau, Jérôme Bourgeois, Gildas Prié, Olivier Hérault, Fabrice Gouilleux, Marie-Claude Viaud-Massuard

### **PA9- Engineering strategies for production of plant alkaloids in yeast: a case study of bioconversion of tabersonine into vindoline**

Florent Lafontaine, Stephanie Brown, Emilien Foureau, Inês Carqueijeiro, Thomas Dugé de Bernonville, Arnaud Lanoue, Sébastien Besseau, Audrey Oudin, Gaëlle Glévarec, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Nicolas Papon, Marc Clastre, Benoit St-Pierre, Sarah E. O'Connor, Vincent Courdavault

### **PA10- Development of new bioinformatics tools for transcriptomic data analysis in order to elucidate signaling and metabolic pathways in plants**

Franziska C. Liesecke, Dimitri Daudu, Gaëlle Glevarec, Sébastien Besseau, Olivier Pichon, Thomas Dugé de Bernonville

**PA11-SUMOylation et agrégation de la protéine TDP-43 : rôle dans la physiopathologie de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)**

Cindy Maurel, Céline Brulard, Sylviane Marouillat, Hélène Blasco, Philippe Corcia, Christian Andres, Patrick Yourc'h

**PA12- Imagerie moléculaire préclinique en TEP pour la maladie de Parkinson : neuroinflammation et neuroprotection**

Steven Vetel, Sylvie Bodard, Julie Busson, Sophie Serrière et Sylvie Chalon

***Filière B***

**PB13- Un milieu riche en chlorure de sodium affecte le système immunitaire**

S. Al Hajj ; A. Héraud ; C. Lefort ; L. Lamendour ; L. Benoist ; M. Büchler ; R. Lemoine ; P. Gatault ; C. Baron ; JM. Halimi

**PB14- Etude des propriétés phénotypiques du VIH-1 associées à l'établissement d'une nouvelle infection**

Maxime Beretta, Alain Moreau, Martine Braibant

**PB15-Détection et phylogénie des séquences rétrovirales dans des transcriptomes d'animaux non modèles**

Diane Bigot, Jean-Philippe Vernadet, Elisabeth A. Herniou, Philippe Gayral

**PB16- Virhostome et cibles thérapeutiques du carcinome à cellules de Merkel**

M Ferté, J Nicol, Y Jacob, C Demeret, P Cassonnet, P Coursaget, A Touzé

**PB17- Type I IFN priming modulates pro-inflammatory response to *E. coli* LPS in chicken macrophages**

Damien Garrido, Adrien Lion, Bernd Kaspers, Sascha Trapp, Catherine Schouler, Rodrigo Guabiraba

**PB18- Les Fibroblastes Cardiaques activés par l'Ischémie-Reperfusion sécrètent des cytokines modifiant le phénotype des cellules dendritiques**

Lefort Claudie, Benoist Lauriane, Chadet Stéphanie, Babuty Dominique, Baron Christophe, Ivanès Fabrice, Angoulvant Denis

***Filière C***

**PC19- A capture-and-release purification strategy to simplify the synthesis of disulfide-rich peptides**

A. Casas, M. Galibert, A. F. Delmas and V. Aucagne

**PC20- Ciblage de facteurs de transcription oncogéniques par un leurre moléculaire à ADN et un ARN interférent vectorisés par des lipopolyplexes**

Geoffrey Casas, Patrick Baril, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Jean-Marc Malinge

**PC21- Gènes de l'Autophagie : marqueurs sanguins potentiels de la Maladie de Parkinson**

Saïd El Haddad, Amandine Serrano, Canan Ozcancak, Pascal Auzou, Frédéric Moal, Antoine Valery, Martine Dubois, Thierry Normand, Stéphane Charpentier, Fabienne Brulé, Lucile Mollet, Alain Legrand

**PC22- Une exposition périnatale au Bisphénol A dichloré altère la composition lipidique hépatique chez la souris**

El Hamrani Dounia, Chepied Amandine, Meme William, Mesnil Marc, Defamie Norah, Meme Sandra

**PC23-Analyse métagénomique du mécanisme de discrimination entre les transcrits codants et non-codants par la machinerie de dégradation de l'ARN**

Kévin Moreau, Aurélia Le Dantec, Christine Mosrin-Huaman et Rachid Rahmouni

**PC24- Analyse des terminateurs Rho-dépendant bactériens**

Cédric Nadiras, Eric Eveno, Annie Schwartz, et Marc Boudvillain

**PC25- Galactofuranosyltransferases of Leishmania: Novel therapeutic targets**

Jihen Atj, Pierre Lafite, Richard Daniellou

**PC26-Monitoring of colorectal cancer by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of urinary nucleoside biomarkers**

M.G. Ayari, A. Krstulja, P. Favetta, P. Manesiotis, A. J. Hall, L. A. Agrofoglio

**PC27- Oxyazidation d'énamides catalysée au fer**

Sylvain Bertho, Romain Rey-Rodriguez et Isabelle Gillaizeau

**PC28- Étude par simulations de dynamique moléculaire de la cinétique du processus d'association récepteur-ligand**

Abdenmour Braka, Samia Aci-Sèche, Stéphane Bourg, Norbert Garnier, Pascal Bonnet

**PC29- Design, synthesis and biological evaluation of LIMK inhibitors**

Anthony Champiré, Karen Plé, Sylvain Routier

**PC30- Synthèse convergente de composés 1,3,5-triazine-2,4,6-trisubstitué ciblant les cystéine cathepsins K & S**

Elżbieta Plebanek, Florian Chevrier, Vincent Roy, Thibault Garenne, Fabien Lecaille, Dawid Warszycki, Andrzej J. Bojarski, Gilles Lalmanach, Luigi A. Agrofoglio

**PC31- Frags2Drugs: A new tool to design new kinase inhibitors from fragments**

José-Manuel Gally, Jean-Thomas Heinrich, Alan Obled, Samia Aci-Sèche, Pascal Bonnet

**PC32- Formation d'oxazolones à partir d'ynamides en présence de sels de Zn**

L. Habert, R. Sallio, I. Gillaizeau

**PC33- Amination de liaisons C – H d'énamides via une catalyse au rhodium**

Jestin Grégory, Rey Rodriguez Romain, Manguin Romane, Darses Benjamin, Dauban Philippe, Gillaizeau Isabelle

**PC34- Altération des modifications post-traductionnelles du cytosquelette par un herbicide organophosphoré, le glufosinate d'ammonium**

Justyne Feat, Géraldine Dilhet, Arnaud Pâris, Céline Dubourg, Stéphane Mortaud

**PC35- IL-33/ST2 attenuates lung epithelial damage and inflammation upon ozone exposure in mice**

Chloé Michaudel, Claire Mackowiak, Aurélie Couturier-Maillard, Julie Piotet-Morin, Isabelle Maillet, Flora Reverchon, Louis Fauconnier, Pauline Chenuet, Valérie Quesniaux, Dieudonnée Togbe and Bernhard Ryffel

**PC36- Impact de la nutrition azotée sur la dynamique de réponse à la sécheresse chez une espèce à croissance rapide : le peuplier**

L. Bouyer, C. Vincent-Barbaroux, M. Feinard-Duranceau, I. Le Jan, A. Delaunay, S. Chamaillard, H. Cochard, T. Barigah, F. Brignolas, R. Fichot

**PC37-Modulation allostérique des récepteurs nicotiques neuronaux des mammifères par les insecticides néonicotinoïdes**

Alison Cartereau, Steeve H. Thany

**PC38-L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en Europe : une approche phylogéographique**

Audrey Bras, Alain Roques, Jérôme Rousselet, Marie-Anne Auger-Rozenberg

**PC39-Photoacoustic imaging of hypoxia during assessment of highly potent antitumor prodrug in mouse models of human tumors**

Raes Florian, Renoux Brigitte, Fuchs Dieter, Trochet Philippe, Lerondel Stéphanie, Papot Sébastien, Le Pape Alain

***Filière D***

**PD40- Bases moléculaires et évolution du mode de vie galligène dans le genre *Caloptilia***

Antoine Guiguet, Carlos Lopez-Vaamonde, Issei Ohshima, David Giron

**PD41- Chémérine, un potentiel lien entre reproduction et métabolisme chez la poule**

N.Mellouk, C.Ramé, M.Marchand, C. Staub, J.L. Touzé, H. Rigoreau, F. Mercierand, J. Delaveau, C. Rat, A. Travel, C. Souchet, P. Froment, J.Dupont

**PD42-The effects of docosahexaenoic acid (DHA, n-3 PUFA), during in vitro maturation, on bovine oocyte developmental competence**

Mouhamad Oseikria, Sébastien Elis and Svetlana Uzbekova

***Posters de participants hors filière***

**P43- A simplified duplex real-time PCR incorporating TaqMan locked nucleic acid (LNA) probes for the simultaneous quantification of *Waddlia chondrophila* and *Listeria monocytogenes* in aborted ruminant samples**

Mohamed Barkallah, Yaakoub Gharbi, Ahlem Ben Slima, Fatma Elleuch, Zouhir Mallek, Rania Ben Saad, Michel Gautier, Radhouane Gdoura, Imen Fendri

**P44- Lipidomics of bovine ovarian follicle using MALDI-TOF Mass Spectrometry.**

Bertavello, P.S., Banliat, C., Teixeira-Gomes A.P., Labas V., Uzbekova S

**P45- Etude métabolomique par RMN de la maladie de Huntington dans un modèle drosophile**

Marylène Bertrand, Hervé Meudal, Martine Decoville & Céline Landon

**P46- Influence de l'expression du FcRn sur le développement tumoral et la réponse au traitement par anticorps thérapeutiques dans un modèle de tumeurs pulmonaires**

Diana Cadena Castaneda, Christine Dhommée, Emilie Dalloneau, Christophe Arnoult, Delphine Fouquenot, Christelle Parent, Laurie Lajoie, Thomas Baranek, Nathalie Heuzé-Vourc'h et Valérie Gouilleux-Gruart

**P47- Machine learning and data mining in Kinase Drug Discovery**

Fabrice Carles, Nicolas Bosc, Christophe Meyer, Pascal Bonnet

**P48- Native Chemical ligation simplifies the access of multidomain antimicrobial peptides: application to the study of big-defensins**

A.F. Delmas, V.P. Terrier, R.D. Rosa, A. Bressan, P. Marceau, A. Vergnes, P. Bulet, E. Bachère, V. Aucagne, D. Destoumieux-Garzón

**P49-Green ultrasound-assisted extraction of natural products from *Silybum marianum* seed with potent cosmetic applications**

Samantha Drouet, Jean Raymond Vanier, Éric Lainé, Christophe Hano

**P50-Apoptotic activity of aqueous extract of *Dunaliella salina* cultivated under stressed condition**

Fatma Elleuch, Patrick Baril, Slim Abdelkafi, Chantal Pichon, Imen Fendri

**P51- Conception et synthèse de nouvelles sondes pour l'imagerie cellulaire de la cholestase**

Marion Gay, Karen Ple, Simone Khalil, Remy Le Guevel, Françoise Brée, Christiane Guguen-Guillouzo, Sylvain Routier

**P52-Unveiling the participation of avian kinin ornithokinin (OK) and its receptors in the chicken inflammatory response**

Damien Garrido, Nathalie K. Chanteloup, Mélanie Pinaud, Angéline Trotereau, Catherine Schouler and Rodrigo Guabiraba

**P53-Apport innovant de la poly-L-Lysine comme agent anti-biofilm dans les sondes d'intubation endotrachéales contaminées par *Pseudomonas aeruginosa* pour prévenir les pneumopathies nosocomiales**

V. Hervé, A.Guillon, D. Fouquenot, C. Henry, E. Morello, S. Georgeault, C. Barc, F. Gauthier et M. Si-Tahar.

**P54-Effects of a biochar amendment to improve the physico-chemical characteristics of a former mine extraction soil contaminated mainly by Pb and As and to enhance the growth of three willow species**

M. Lebrun, C. Macri, N. Hattab-Hambli, F. Miard, M.I Motelica-Heino, S. Bourgerie and D. Morabito

**P55- La Résonance Magnétique Nucléaire pour la chimie et pour la biologie**

Hervé Meudal, Marylène Bertrand, Laurence Jouvensal, Agnès Delmas, Françoise Paquet, Karine Loth & Céline Landon

**P56-Confocal Raman spectroscopy for transepidermal tracking of nano-encapsulated cosmetics bioactive compounds**

L. Miloudi, F. Bonnier, H.T.P. Nguyen, A. Tfayli, F. Yvergnaux, I. Hourpa, E. Munnier

**P57- Imagerie de bioluminescence pour les champignons filamenteux colonisant les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose: Application à l'espèce *Scedosporium apiospermum***

Anaïs Hérivaux, Amandine Gastebois, Patrick Vandeputte, Charlotte Godon, Bénédicte Lelièvre, Maxime Fleury, Jean-Philippe Bouchara, Jean-Paul Latgé, Nicolas Papon

**P58-New Inhibitors Targeting Stat5 in Leukemia Cells**

Ludovic Juen, Marie Brachet-Botineau, Jérôme Bourgeais, Gildas Prié, Olivier Hérault, Fabrice Gouilleux, Marie-Claude Viaud-Massuard

# ***POSTERS***

## **Metabolomic screening in a large germplasm collection of grape *Vitis vinifera* L. Insights for the selection of polyphenol-rich varieties**

Kévin Billet<sup>1</sup>, Benjamin Houillé<sup>1</sup>, Thomas Dugé de Bernonville<sup>1</sup>, Guillaume Delanoue<sup>2</sup>, Sébastien Besseau<sup>1</sup>, Audrey Oudin<sup>1</sup>, Vincent Courdavault<sup>1</sup>, Marc Clastre<sup>1</sup>, Laurence Guerin<sup>2</sup>, Nathalie Guivarc'h<sup>1</sup>, Arnaud Lanoue<sup>1</sup>

1. EA 2106 « Biomolécules et Biotechnologie Végétales », Université François-Rabelais de Tours, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 av. Monge, F37200 Tours, France

2. Institut Français de la vigne et du Vin, 46 avenue Gustave Eiffel - 37100 TOURS

Grape accumulates numerous polyphenols with abundant health benefit and organoleptic properties that in planta act as key components of the plant defense system against diseases. Considerable advances have been made in the chemical characterization of wine metabolites particularly volatile and polyphenolic compounds. However, the metabotyping (ie, metabolite-phenotype characterization) of grape varieties, from polyphenolic-rich vineyard by-products (grape canes) is unprecedented. The aim of this study was to assess to the variability of polyphenol metabolism across a large collection of European grape varieties selected according to their genetic distance. The present polyphenol metabotyping approach coupled to multivariate statistical analyses might assist grape selection programs to improve plant defense traits and/or plant extracts with health-benefit potential.

Topic: Metabolomics for sustainable viticulture.

Keywords: grape metabotyping, polyphenol metabolism, genetic diversity

## Analyse métabolomique d'une cohorte d'autistes Libanais

Tania Bitar<sup>1,2</sup>, Walid Hleihel<sup>2</sup>, Lydie Nadal-Desbarats<sup>1,4</sup>, Patrick Emond<sup>1,4</sup>, Sylvie Mavel<sup>1</sup>, Christian R. Andres<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Université François Rabelais, INSERM U930, Equipe neurogénétique et neurométabolomique, Tours France, <sup>2</sup>Faculté Médecine, Université Saint Esprit de Kaslik, BP 446 Jounieh, Liban, <sup>3</sup>CHRU de Tours, laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, France, <sup>4</sup>Université François Rabelais, PPF « analyses des systèmes Biologiques », Tours France

Les Troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux caractérisés par des déficits au niveau de la communication, des interactions sociales et des comportements restreints et répétitifs. A ce jour, il n'existe pas de marqueurs biologiques pour diagnostiquer les TSA. Des études métabolomiques cherchent à identifier des biomarqueurs aidant au diagnostic précoce et à une meilleure compréhension de la physiopathologie. Aucune étude métabolomique sur les TSA n'a été réalisée sur une population Moyen-Orientale Libanaise. Nous nous sommes proposés d'étudier des échantillons urinaires d'une cohorte d'autistes libanais. Nous avons exploré le métabolome urinaire de 40 autistes et de 40 témoins Libanais appariés sur le sexe, l'âge et l'origine géographique, en utilisant trois modalités analytiques complémentaires: la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1D), La RMN proton-carbone (RMN 2D) et la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC-MS). Les résultats obtenus ont été étudiés par analyses statistiques multivariées (analyses discriminantes orthogonales partielles des moindres carrés (OPLS-DA)). Les 80 échantillons ont été divisés en 2 groupes : un groupe d'apprentissage (n=50) et un groupe de validation (n=30). Le modèle OPLS-DA a été appliqué sur le groupe d'apprentissage afin d'obtenir un modèle de discrimination entre les 2 groupes étudiés et d'identifier les métabolites participant à cette discrimination. Ce modèle a été évalué par la suite sur la cohorte de validation et par une courbe ROC. Les performances du modèle ont montré des valeurs  $R^2Y= 0,926$ ,  $Q^2= 0.82$  et  $CV-ANOVA= 2.19.10^{-12}$ . La courbe ROC a montré une spécificité de 93%, une sensibilité de 86% et une  $AUC= 0.94$ . À partir des métabolites responsables de la discrimination entre les TSA et les contrôles, des voies métaboliques perturbées sont proposées pour une meilleure compréhension de la physiopathologie des TSA.

Thème : Etude métabolomique

Mots-clés : Troubles du spectre autistique, TSA, RMN, HPLC-MS, OPLS-DA, groupe d'apprentissage, groupe de validation, ROC

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## Les fonctions inexplorées du liquide amniotique chez l'oiseau

Mylène Da Silva, Aurélien Brionne, Valérie Labas, Lucie Combes-Soia, Maryse Mills, Magali Chessé, Yves Nys, Sophie Réhault-Godbert

UR83 Recherches Avicoles, INRA-Tours Val de Loire. Equipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf ».

Tout comme chez les mammifères, le liquide amniotique (LA) chez les oiseaux a pour fonction primaire de préserver l'embryon des chocs et de la déshydratation, mais ses autres fonctions restent encore peu connues. Des études protéomiques ont permis de démontrer que chez l'humain le LA a des fonctions bien plus complexes, et est notamment impliqué dans la défense de l'embryon de par les nombreuses protéines antimicrobiennes qu'il contient 1,2. Chez les espèces ovipares, l'œuf contient l'ensemble des éléments assurant le développement embryonnaire dans un milieu externe, ce qui nécessite une anticipation des besoins de l'embryon, et la présence de molécules uniques au modèle ovipare. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de caractériser le LA chez les oiseaux et d'en dégager d'éventuelles spécificités.

Nous avons dans un premier temps réalisé une étude de protéomique par spectrométrie de masse sur du LA d'œuf de poule prélevé au 11<sup>ème</sup> jour du développement, avant le transfert des protéines du blanc d'œuf dans ce compartiment. Une analyse fonctionnelle des 106 protéines identifiées par Gene Ontology et par bibliographie, nous a permis de déterminer que les protéines du LA de la poule étaient notamment impliquées dans la morphogénèse (différenciation cellulaire, apoptose...), dans la réponse au stress (pathogènes), mais aussi dans le transport de molécules (ions, oxygène...). Cette analyse est actuellement complétée par des tests d'activités biologiques (activités protéolytiques, antimicrobiennes...).

D'autre part, la comparaison avec le protéome du LA chez l'humain a mis en évidence les fonctions communes du LA chez les ovipares et les vivipares, et a par ailleurs souligné les spécificités fonctionnelles du LA de l'oiseau.

1 Cho et al. *Molecular & cellular proteomics* 6 (2007) 1406-15

2 Michaels et al. *Journal of proteome research* 6 (2007) 1277-85

Thème : Fonctions biologiques de l'œuf de poule

## **Impact de l'acclimatation embryonnaire à la chaleur chez le poulet sur des modifications post-traductionnelles des histones**

DAVID Sarah-Anne<sup>1</sup>, PIEGU Benoit<sup>2</sup>, HENNEQUET-ANTIER Christelle<sup>1</sup>, BORDEAU Thierry<sup>1</sup>, CROCHET Sabine<sup>1</sup>, COUROUSSE Nathalie<sup>1</sup>, BEAUCLAIR Linda<sup>2</sup>, COLLIN Anne<sup>1</sup>, COUSTHAM Vincent<sup>1</sup>

<sup>1</sup>URA, INRA, 37380, Nouzilly, France

<sup>2</sup>PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

A l'heure actuelle, les poulets sélectionnés pour leurs performances sont sensibles aux variations de température. Le traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur (TAEC) permet de rendre les animaux plus résistants en cas de coup de chaleur à l'âge d'abattage. Le TAEC consiste à augmenter de façon cyclique la température d'incubation des œufs entre les jours E7 et E16 de l'embryogenèse, ce qui modifie la physiologie, le métabolisme et l'expression des gènes musculaires à long terme.

L'altération de l'environnement précoce peut avoir un impact à long terme sur l'expression des gènes notamment par le biais de modifications épigénétiques. Les modifications d'expression de gènes observées chez les poulets à l'âge d'abattage pourraient être dues à une altération de l'épigénome induite par le TAEC lors de l'embryogenèse et persistante au cours du développement. Nous nous sommes intéressés à H3K27Me3, une modification post-traductionnelle des histones (MPTH). Cette marque épigénétique est décrite comme ayant un rôle dans la mémoire épigénétique d'un état répressif suite à l'influence de l'environnement.

Afin d'étudier des MPTH j'ai mis au point la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans l'hypothalamus qui est le centre de la thermorégulation. Le ChIP a été suivi d'un séquençage à haut débit afin de déterminer sans a priori les régions différenciellement enrichies en H3K27Me3 entre les individus témoins et acclimatés.

Thème : Epigénétique et environnement

Mots-clés : Epigénétique, poulet, hypothalamus, séquençage à haut débit, réchauffement climatique

## Genetic manipulation of relevant *Candida*-related species

Tatiana A. Defosse<sup>1,2</sup>, Sébastien Besseau<sup>1</sup>, Thomas Dugé de Bernonville<sup>1</sup>, Céline Melin<sup>1</sup>, Arnaud Lanoue<sup>1</sup>, Gaëlle Glévarec<sup>1</sup>, Audrey Oudin<sup>1</sup>, Joël Crèche<sup>1</sup>, Marc Clastre<sup>1</sup>, Vincent Courdavault<sup>1</sup>, Jean-Philippe Bouchara<sup>2</sup>, Nathalie Giglioli-Guivarc'h<sup>1</sup> and Nicolas Papon<sup>2</sup>

1 Université François-Rabelais de Tours, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, EA 2106, Tours, France.

2 UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Angers, France.

Many ascomycetous yeast species from the CTG fungal clade are cosmopolite and act as common saprophytic constituents of the human microflora. However, on the one hand, some of these yeasts can become opportunistic pathogens and cause diseases termed “candidiasis”, such as *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. On the other hand, parts of those species are important models in biotechnology like *Scheffersomyces stipitis* and *Candida guilliermondii*. Importantly, the fungal CTG clade displays a particular genetic code: the universal leucine CUG codon is predominantly translated as serine and rarely as leucine. It still precludes the use of the widely available markers and reporter systems for genetic approaches in these yeasts. Thus, no standardized protocols of transformation as well as no generic molecular tools have emerged for these species. We provide here a global strategy to genetically manipulate a wide range of CTG clade yeasts. This includes a generic transformation protocol and a useful molecular toolbox allowing gene knock out, heterologous gene expression, fluorescence labeling for subcellular localization studies and construction of luciferase-expressing yeasts for in vivo bioluminescence imaging in animals. These genetic approaches represent an essential prerequisite for further successful development of CTG clade yeasts research in medical mycology but also will expedite future practical uses of these fungi of biotechnological interest.

## **Composition en acides gras du tissu adipeux péri-prostatique (TAPP) : association avec l'agressivité tumorale, l'origine ethno-géographique, et la migration des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro***

S. Figiel<sup>1</sup>, G. Fromont<sup>1,2</sup>, K. Maheo<sup>1</sup>, I. Domingo<sup>1</sup>, R. Guibon<sup>1,2</sup>, P. Besson<sup>1</sup>, M. Pinault<sup>1</sup>, C. Guimaraes<sup>1</sup>, Bruyère<sup>2</sup>, R. Mathieu<sup>3</sup>, AR. Azzouzi<sup>4</sup>, MA. Perrouin-Verbe<sup>5</sup>, J. Rigaud<sup>6</sup>, P. Blanchet<sup>7</sup>, et L. Multigner<sup>8</sup>

1 Inserm U1069, Tours ; 2 CHRU Bretonneau, Départements de Pathologie et d'Urologie, Tours ; 3 CHU Rennes ; 4 CHU Angers ; 5 CHU Brest ; 6 CHU Nantes ; 7 CHU Pointe à Pitre ; 8 IRSET Rennes

Des facteurs génétiques et environnementaux ont été associés à l'agressivité du cancer de la prostate (CaP). Le tissu adipeux (TA), dont la composition en acides gras (AG) reflète l'apport nutritionnel, est potentiellement impliqué dans la progression du CaP. L'objectif est d'analyser la composition en AG du TAPP, et de corrélérer ces résultats à l'origine ethno-géographique des patients et à l'agressivité tumorale. La composition en AG du TAPP a été analysée chez 156 patients atteints d'un CaP (106 caucasiens et 50 antillais). Chaque population comporte autant de tumeurs indolentes que d'agressives, appariées pour l'âge. La migration des cellules cancéreuses prostatiques DU145 a été étudiée en présence des AG extraits de chaque TAPP. Les TAPP des patients antillais ont un taux plus élevé d'acide linoléique (AL), AGPI n-6, par rapport aux patients caucasiens. Dans cette population, l'AL est associé à l'indolence, et les AG saturés et monoinsaturés à l'agressivité. Chez les patients caucasiens, l'indolence est associée au taux d'EPA, AGPI n-3. *In vitro*, la migration des cellules cancéreuses est corrélée négativement au taux d'AL dans les TAPP des patients antillais, et positivement au taux d'acide palmitique (AG saturé). Ces résultats soulignent une importante variation ethno-géographique des TAPP, dans leur composition en AG, leur association à l'agressivité tumorale, et l'effet de leur fraction lipidique sur la migration cellulaire.

Thème : oncologie, lipides

Mots-clés : cancer de la prostate, acides gras, tissu adipeux péri-prostatique, migration

## Rôle du canal calcique voltage dépendant CaV1.3 dans la biologie des cellules épithéliales cancéreuses du colon

Fourbon Y.<sup>1\*</sup>, Guéguinou M.<sup>1\*</sup>, Felix R.<sup>1</sup>, Hugen A.<sup>2</sup>, Lajoie L.<sup>3</sup>, Lecomte T.<sup>3,5</sup>, Fromont G.<sup>1,5</sup>, Chatelier A.<sup>4</sup>, Constantin B.<sup>4</sup>, Mignen O.<sup>2</sup>, Potier-Cartereau M.<sup>1</sup>, Chantôme A.<sup>1\*</sup>, Bois P.<sup>4\*</sup>, Vandier C.<sup>1\*</sup>

1 Inserm U1069 N2C, Université de Tours. 2 Inserm UMR 1078 IFR148 Université de Bretagne Occidentale. 3GICC–UMR 7292 Université de Tours. 4 Equipe ERL 7368 CNRS Université de Poitiers. 5 CHU Bretonneau Tours \* Participation équivalente

Il est généralement admis que les canaux calciques voltage dépendant CaV dont fait partie le CaV1.3 régulent l'homéostasie calcique des cellules excitables suite à une dépolarisation. Cependant, peu d'étude se sont intéressée au rôle du CaV1.3 dans les cellules dites non excitables et en particulier dans les cellules épithéliales cancéreuses. Le but de notre étude a été de caractériser le rôle de la protéine CaV1.3 dans la biologie des cellules cancéreuses HCT116. Nos études montrent que la protéine CaV1.3 est surexprimée dans des biopsies de cancer colorectal comparées à des tissus sains. Le vérapamil, un inhibiteur pharmacologique du CaV1.3 et des ARN interférentiels ciblant la protéine CaV1.3 (siRNA), réduisent la migration des cellules de cancer du côlon HCT116. Ces ARN interférentiels réduisent également la concentration basale de calcium intracellulaire et la fréquence d'oscillations calciques induites par l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Cependant, la dépolarisation membranaire n'a pas induit d'augmentation de calcium intracellulaire et aucun courant de type CaV n'a pu être enregistré en patch-clamp. Des études de cytométrie en flux démontrent que seulement 10% des Cav1.3 sont à la membrane plasmique. L'ensemble de ces données suggèrent que le CaV1.3 ne formerait pas un canal au niveau de la membrane plasmique, mais participerait à la régulation de l'homéostasie calcique et à la migration cellulaire des HCT116 par un autre mécanisme qui reste à déterminer.

Thèmes : Cancer – Canaux Ioniques

Mots-clés : Calcium ; Canaux Calciques ; Cancer Colorectal ; Migration

## Nouveaux inhibiteurs ciblant la protéine Stat5 dans les cellules leucémiques

Ludovic Juen<sup>a</sup>, Marie Brachet-Botineau<sup>b,c</sup>, Jérôme Bourgeois<sup>b,c</sup>, Gildas Prié<sup>\*a</sup>, Olivier Hérault<sup>b,c</sup>, Fabrice Gouilleux<sup>b</sup>, Marie-Claude Viaud-Massuard<sup>a</sup>

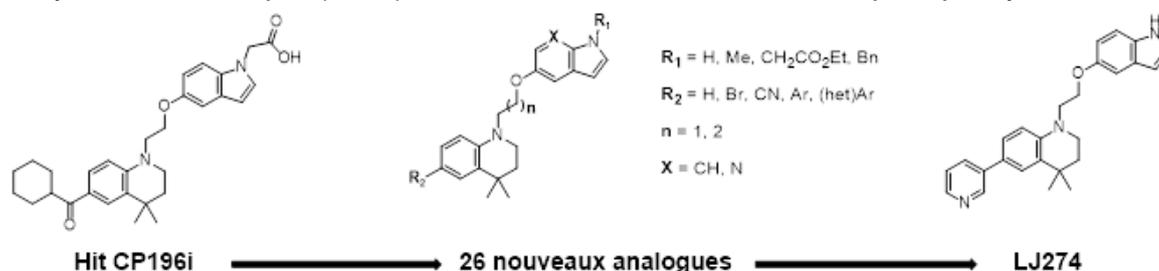
a Equipe IMT "Innovation Moléculaire et Thérapeutique" - GICC UMR 7292 CNRS - Université de Tours - Labex SYNORG - Faculté de Pharmacie - 31 avenue Monge - 37200 Tours.

b Equipe LNOx "Niche leucémique & métabolisme oxydatif" - GICC UMR 7292 CNRS - Université de Tours - Faculté de Médecine - Bâtiment Dutrochet - 10bis boulevard Tonnellé - 37032 Tours.

c CHRU de Tours - Service d'Hématologie Biologique - 2 boulevard Tonnellé - 37044 Tours.

Depuis quinze ans, de nombreux faits expérimentaux ont souligné le rôle de la protéine Stat5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) dans la genèse des leucémies. Des données plus récentes ont montré l'importance de Stat5 dans l'autorenouvellement et la quiescence des cellules souches hématopoïétiques normales (CSH) et leucémiques (CSL). Le ciblage de Stat5 contribuerait donc à diminuer la survie, l'autorenouvellement et la quiescence des cellules cancéreuses dont les CSL, et la résistance potentielle de ces cellules à des agents anti-cancéreux.

Lors d'un précédent criblage sur une série de composés issus de notre laboratoire, le Dr. Gouilleux a montré que l'un d'eux, le CP196i, inhibe la croissance de la lignée de leucémie myéloïde chronique (LMC) KU812 et réduit modérément la phosphorylation de Stat5.



A partir de ce « hit », 26 nouveaux analogues ont été synthétisés et évalués par des tests de prolifération et de viabilité cellulaires (MTT) sur les lignées de LMC KU812 et K562. Parmi ces analogues, le LJ274 montre une activité cytotoxique intéressante sur des modèles cellulaires de LMC (KU812 ; EC50 : 5  $\mu\text{M}$  / K562 ; EC50 : 9  $\mu\text{M}$ ). En outre, LJ274 inhibe la phosphorylation et surtout l'expression de Stat5 sur les lignées KU812, mais également sur les lignées de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) KG1a et MV4-11 et lymphoblastiques (LAL) Nalm6, dès 48 h de traitement.

Thème : chimie médicinale

Mots-clés : chimie hétérocyclique, pharmacomodulation, Stat5, leucémie

Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016

## Engineering strategies for production of plant alkaloids in yeast: a case study of bioconversion of tabersonine into vindoline

Florent Lafontaine<sup>1</sup>, Stephanie Brown<sup>2</sup>, Emilien Foureau<sup>1</sup>, Inês Carqueijeiro<sup>1</sup>, Thomas Dugé de Bernonville<sup>1</sup>, Arnaud Lanoue<sup>1</sup>, Sébastien Besseau<sup>1</sup>, Audrey Oudin<sup>1</sup>, Gaëlle Glévarec<sup>1</sup>, Nathalie Giglioli-Guivarc'h<sup>1</sup>, Nicolas Papon<sup>1</sup>, Marc Clastre<sup>1</sup>, Benoit St-Pierre<sup>1</sup>, Sarah E. O'Connor<sup>2</sup>, Vincent Courdavault<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université François Rabelais, EA2106 Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Tours

<sup>2</sup> Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich, UK

The monoterpene indole alkaloids (MIAs) are a vast class of plant specialized metabolites displaying high pharmaceutical value. Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) is a unique source of the dimeric molecules vincristine and vinblastine. However, those anticancer compounds are poorly abundant and expensive to extract from plants.

The development of omics resources, and reverse genetic tools such as Virus Induced Gene Silencing (VIGS) led to the elucidation of several missing steps in the MIA biosynthetic pathway. This opened the way for producing alkaloids in heterologous host.

Identification of a missing short-chain dehydrogenase allowed completion of a seven-step segment pathway from tabersonine to vindoline. These seven genes were transferred into the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using either an integrative strategy or a plasmid-based autoreplicative system. A fine tune of culture parameters reduced byproducts flux, reaching a 28% conversion rate of tabersonine into vindoline.

In the future, the limiting conversion rate of several enzymes may be overcome using overexpression or fusion strategies. Since abundant supply of tabersonine is available from African medicinal plants, bioproduction of vindoline by this process has important industrial potential.

Thème: alkaloid production by metabolic engineering in yeast

Mots clefs: *Catharanthus roseus*, monoterpene indole alkaloids, metabolic engineering

## **Development of new bioinformatics tools for transcriptomic data analysis in order to elucidate signaling and metabolic pathways in plants**

Franziska C. Liesecke, Dimitri Daudu, Gaëlle Glevarec, Sébastien Besseau, Olivier Pichon, Thomas Dugé de Bernonville

EA2106 Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Tours

Gene expression networks are often used to predict functions or assign physiological roles to query genes. Transcript abundance is used to correlate genes and to establish a putative association between them. In spite of the plethora of gene expression databases that are available online, it is still difficult to use large scale expression matrix to test correlation between many query genes, in particular when studying signaling or metabolic pathways. We aim at developing approaches dedicated to complete the analysis of signaling and metabolic pathways by analyzing transcriptional relationships between many genes. Our main approach uses co-expression lists of query genes established by PCC computation and further gene ranking. These lists are used to construct co-expression networks. Using Arabidopsis expression data, we apply this strategy currently to the cytokinin signaling and phenylpropanoid biosynthetic pathways. To cluster query genes, this approach is useful to analyze the transcriptional neighborhood of selected genes and to find new physiological processes associated to the clusters. Main challenges in this approach are to fix meaning thresholds for co-expressed gene selection which limit false-positive rate without discarding significant genes and retrieve problems inherent to the manipulation of large-scale datasets. To date, we developed a methodology useable in any organism and applicable to distinct cellular pathways. It is particularly adapted to model species for which large expression matrix can be prepared by re-use of published data.

Thème : Elucidation of cellular pathways with bioinformatics tools

Mots-clés : Transcriptomics, Signaling, Metabolism, Co-expression network

## **SUMOylation et agrégation de la protéine TDP-43 : rôle dans la physiopathologie de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)**

Cindy Maurel<sup>1</sup>, Céline Brulard<sup>1</sup>, Sylviane Marouillat<sup>1</sup>, Hélène Blasco<sup>1,2</sup>, Philippe Corcia<sup>1,3</sup>, Christian Andres<sup>1,2</sup>, Patrick Vourc'h<sup>1,2</sup>

1 UMR INSERM U930, Equipe « Neurogénétique et Neurométabolomique », Université François-Rabelais, 37032 Tours, France.2 CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, 37044 Tours, France.3 CHRU de Tours, Service de Neurologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie multifactorielle impliquant des facteurs génétiques (30 gènes, dont SOD1 et TARDBP) et des facteurs environnementaux. Des agrégats protéiques contenant la protéine TDP43 codée par TARDBP, muté ou non, sont présents dans les motoneurones chez 90% des patients. Une étude de l'équipe a montré l'implication du mécanisme post-traductionnelle de SUMOylation dans la formation des agrégats dans un modèle in vitro de cellules surexprimant SOD1 mutée, suggérant un rôle pour la SUMOylation dans la SLA (Dangoumau et al, 2015). Mon travail de thèse porte sur l'étude du rôle de la SUMOylation dans la formation des agrégats TDP43-positifs dans les motoneurones. L'ADNc humain de TARDBP a été cloné en phase avec une séquence codant la protéine GFP (clonage en N-terminal) dans un vecteur plasmidique. La mutation A315T retrouvée chez certains patients SLA, a été insérée par mutagenèse dirigée dans la séquence de TARDBP. Les plasmides ont été utilisés pour transfecter des cellules d'une lignée d'épithélium rénal humain (HEK293T), d'une lignée motoneuronale de souris (NSC34) et des motoneurones d'embryon de souris. Des analyses en western blot du lysat protéique des cellules HEK293T et NSC34 transfectées ont montrées l'expression des protéines attendues. Par immunocytochimie associée à la microscopie confocale, nous avons observé la présence d'agrégats TDP43-GFP positifs dans les cellules sur-exprimant TDP43 sauvage ou mutée. Les premières études de co-localisation TDP43/SUMO indiquent la présence de la protéine SUMO1 dans ces agrégats.

Des expériences d'immunoprécipitation sont en cours pour regarder si la co-localisation de SUMO-1 dans les agrégats TDP43 positifs est causée par la SUMOylation de la protéine TDP43 elle-même. Des plasmides exprimant TDP43 sauvage ou muté A315T avec le site du SUMOylation muté (K136R) sont en construction afin d'étudier l'effet de l'inhibition de la SUMOylation sur la mise en place des agrégats TDP43 positifs. Des études similaires sur la SUMOylation de TDP43 seront également réalisées prochainement dans un modèle souris de la SLA exprimant un mutant de TDP43.

Thème : Maladie neurodégénérative

Mots clefs : SLA, TDP- 43, SUMO, agrégats

## **Imagerie moléculaire préclinique en TEP pour la maladie de Parkinson : neuroinflammation et neuroprotection**

Steven VETEL, Sylvie BODARD, Julie BUSSON, Sophie SERRIERE et Sylvie CHALON

UMR Inserm U930 équipe 3 « Imagerie moléculaire du cerveau », Université de TOURS

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième pathologie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer en France. Elle se caractérise par une perte massive et progressive des neurones dopaminergiques de la Substance Noire pars compacta, engendrant une déplétion en dopamine striatale. Cette neurodégénérescence entraîne l'apparition de symptômes moteurs tels que des tremblements au repos et de l'instabilité posturale. Actuellement, il existe des traitements symptomatiques efficaces basés sur la restauration du taux de dopamine (administration de L-DOPA) ou sur le contrôle de structures dépendantes du striatum (stimulation cérébrale profonde). Cependant, le processus neurodégénératif reste non contrôlé, ne permettant pas de ralentir l'évolution de la MP. Parmi les facteurs impliqués dans la physiopathologie de la MP, la neuroinflammation joue un rôle important où elle se traduit en outre par une activation de la microglie environnante. Plusieurs études suggèrent qu'une stimulation spécifique des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  ( $R\alpha 7$ ) induit une neuroprotection en réduisant les processus inflammatoires, ouvrant ainsi une nouvelle voie thérapeutique pour la MP. De plus, des données préliminaires du laboratoire montre que l'administration d'un agoniste des  $R\alpha 7$ , le PHA543613, induit une réduction de l'activation microgliale dans un modèle de neuroinflammation aiguë chez le rat. Ce travail de thèse vise donc à étudier les effets neuroprotecteurs d'agonistes des  $R\alpha 7$ , comme le PHA543613, sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée induite par une lésion à la 6-hydroxydopamine chez le rat. Les effets seront évalués en utilisant une technique d'imagerie moléculaire, la Tomographie par Emission de Positons (TEP), à l'aide de traceurs fluorés. L'utilisation de la TEP permettant un suivi longitudinal de la neurodégénérescence et de la neuroinflammation chez l'animal.

Thème : Neurosciences

Mots-clés : Maladie de Parkinson, neuroinflammation, récepteurs nicotiques  $\alpha 7$ , Tomographie par Emission de Positons

## Un milieu riche en chlorure de sodium affecte le système immunitaire

S. Al Hajj ; A. Héraud ; C. Lefort ; L. Lamendour ; L. Benoist ; M. Büchler ; R. Lemoine ; P. Gatault ; C. Baron ; JM. Halimi.

EA 4245, Université François-Rabelais, Tours, France; Néphrologie-hémodialyse, CHU tours, Tours, France

**Introduction** : Une consommation excessive de sel peut entraîner le développement d'hypertension. Ainsi qu'une forte concentration en Sodium polarise la réponse immunitaire des lymphocytes T vers TH17. En outre, un régime alimentaire riche en sel augmente la concentration sodique interstitielle (de 140 jusqu'à 200 mM) et la densité dermique en cellules dendritiques (CD). En plus, il a été montré que l'hypertension est transférable aux animaux normo-tendus par infusion des CD des animaux hypertendus. Cependant, l'effet du sel sur les fonctions des CD restent inconnus.

**Matériels et méthodes** : Dans cette étude, nous avons analysé l'effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la différenciation et la maturation des CD humaines in vitro. Les CD sont dérivées des monocytes du sang humain différenciées pendant 6 jours en culture (RPMI, 10% SVF, GM-CSF [66 ng / ml] et IL4 [25 ng / ml]) puis stimulées pendant 48 h avec du LPS à 2,5 ng / ml à différentes concentrations de NaCl [140, 160, 180, 200 mM]. Nous avons analysé la viabilité des cellules (AnV;IP) et l'expression cellulaire de CCR7, CD25, CD86 et CD83 par cytométrie en flux. Nous avons également étudié la différenciation des monocytes en CD exprimant DC-Sign sous différentes concentrations de NaCl.

**Résultats** : La viabilité des CD était stable jusqu'à 180 mM [NaCl], pour atteindre 60 % à 200 mM [NaCl] puis finir pour 5% à 240 mM [NaCl]. Seules les CD vivantes ont été analysées en cytométrie. Lors de la différenciation des monocytes en CD l'expression du DC-Sign a diminué de 86,7% à 37,2% pour 140 et 200 mM, respectivement. Une concentration croissante en NaCl a réduit l'expression des marqueurs de maturation (CD25+ :  $91,3 \pm 2,8$  à  $79,6 \pm 5,9\%$  ; CD86 + :  $92,5 \pm 4,4$  à  $77,2 \pm 3,0\%$  ; CD83 + :  $91,8 \pm 4,4$  à  $77,2 \pm 5,6\%$ ) pour 140 et 200 mM de NaCl, respectivement. À noter que l'expression de CCR7 a diminué de ( $47,4 \pm 12,5$  à  $19,4 \pm 12,2\%$ ) pour 140 et 200 mM. Conclusion : Une forte concentration en sel retarde la différenciation des monocytes en CD, et inhibe le processus de maturation. La baisse de CCR7 suggère une inhibition de la migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les concentrations en NaCl affectent les fonctions immunogènes des CD.

Thème : Immunologie et inflammation.

Mots-clés : Cellules dendritiques, NaCl, différenciation, fonctions immunogènes.

## **Etude des propriétés phénotypiques du VIH-1 associées à l'établissement d'une nouvelle infection**

Maxime Beretta, Alain Moreau, Martine Braibant  
INSERM U966-Tours

L'étude de la transmission sexuelle du VIH-1 a révélé que le plus souvent un seul ou un nombre limité de variants viraux parmi ceux présents chez le donneur étaient transmis, soulignant un phénomène de restriction au moment de la transmission. Il en résulte une population virale génétiquement très restreinte en début d'infection, par opposition à celle retrouvée chez les sujets chroniquement infectés très hétérogène. La question qui se pose est de savoir si ce processus de restriction est un événement stochastique ou s'il sélectionne des virus présentant des propriétés biologiques particulières qui les prédisposent à établir plus efficacement de nouvelles infections. Pour étudier ce phénomène, il est extrêmement difficile d'avoir accès à des prélèvements de sujets « donneurs » et de sujets « receveurs » identifiés au stade de primo infection. Un moyen indirect est d'identifier des clusters de transmission définis par un groupe de virus très proches génétiquement et provenant de différents patients en stade de primo infection, formant ainsi une chaîne de transmission.

A partir du plasma de ces patients, nous avons généré des virus pseudotypés exprimant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe représentant la population virale de chaque patient. Ce modèle d'étude permet de se focaliser uniquement sur les caractéristiques de l'enveloppe possédant un rôle principal dans les étapes précoces de l'infection cellulaire.

La sensibilité à la neutralisation des virus pseudotypés a été testée en présence d'un panel d'anticorps largement neutralisants ciblant les principaux sites de vulnérabilité de la glycoprotéine d'enveloppe. Les résultats ont montré une homogénéité de sensibilité/résistance à l'intérieur de chaque cluster de transmission. Ce phénomène témoigne de la conservation antigénique de l'enveloppe du variant transmis, renforçant l'hypothèse d'une sélection lors de la transmission. De plus certains épitopes ciblés, comme le site de fixation au CD4, la boucle variable V3 et l'interface gp120/gp41 possèdent des profils de neutralisation sensibles et homogènes entre nos différents clusters, indiquant une conservation importante de ces trois régions. Par la suite, la réalisation de différents tests fonctionnels nous permettra d'analyser la nature de l'avantage sélectif de ces variants. Des résultats préliminaires de sensibilité au CD4 soluble ainsi que de mesure d'interaction au DC-SIGN n'ont pas montré d'homogénéité au sein de nos clusters. En revanche l'homogénéité intra-cluster observée pour la sensibilité au T20 (inhibiteur de fusion) et au Maraviroc (inhibiteur du co-récepteur CCR5) pourrait témoigner d'un avantage sélectionné au cours de l'évènement de transmission.

La mise en évidence d'un avantage sélectif des virus transmis pourrait ouvrir la voie vers le développement de stratégies prophylactiques plus efficaces contre ces variants

## Détection et phylogénie des séquences rétrovirales dans des transcriptomes d'animaux non modèles

Diane Bigot, Jean-Philippe Vernadet, Elisabeth A. Herniou, Philippe Gayral

UMR-CNRS 7261, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, Av Monge, Parc Grandmont, 37200 Tours

Les rétrovirus font partie des virus les plus étudiés de la planète. Cependant, nos connaissances sur leur diversité, leur origine et leur évolution sont incomplètes. L'objectif de cette étude est une recherche globale de la présence rétrovirale à partir de transcriptomes d'animaux non-modèles. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé la prédiction de cadre ouverts de lectures des contigs issus des assemblages de 534 transcriptomes individuels (147 espèces animales). Dans un second temps, une analyse ciblée d'homologies avec les rétrovirus a été réalisée en utilisant une base de données protéique virale, puis en réalisant une seconde recherche réciproque sur une base de données protéique généraliste. Enfin, des analyses de reconstruction et annotation de génomes viraux, suivies d'analyses phylogénétiques ont permis de replacer de nouveaux virus découverts dans la phylogénie des rétrovirus. Ce travail a permis notamment la reconstruction d'un nouveau génome complet de Spumavirus chez la salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*), et d'un deuxième génome viral partiel chez le triton de Waltl (*Pleurodeles waltl*). Des séquences de Spumavirus ont été également trouvées dans le transcriptome de la salamandre d'Hokkaido (*Hynobius retardatus*) et le génome de l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Notre analyse phylogénétique a montré que ces 4 séquences rétrovirales d'urodèles appartiennent bien aux Spumavirus et forment un groupe monophylétique, différent des virus d'amphibien endogènes connus. Ce travail a permis la découverte d'une nouvelle lignée rétrovirale de Spumavirus, probablement endogène et qui semble spécifique des urodèles.

Thème : Découverte d'un nouveau Spumavirus d'amphibien

Mots-clés: Rétrovirus, Transcriptomes, Phylogénie, Spumavirus, *Salamandra salamandra*

## **Virhostome et cibles thérapeutiques du carcinome à cellules de Merkel**

M Ferté<sup>1</sup>, J Nicol<sup>1</sup>, Y Jacob<sup>2</sup>, C Demeret<sup>2</sup>, P Cassonnet<sup>2</sup>, P Coursaget<sup>1</sup>, A Touzé<sup>1</sup>

1.Université François Rabelais, Biologie des infections à Polyomavirus, INRA UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, Tours, 2.Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Département de Virologie, Paris

Le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV) est reconnu depuis 2012 par l'IARC comme l'agent étiologique du carcinome à cellules de Merkel chez l'Homme. Cependant, les mécanismes conduisant à l'infection puis à l'oncogenèse viro-induite sont peu connus. Nos travaux ont pour objectifs d'identifier les partenaires cellulaires des oncoprotéines (antigènes T et t) du MCPyV afin caractériser son virhostome (virus-host interactome). L'identification des interactions entre les partenaires cellulaires et les protéines virales est réalisée par l'utilisation de la technologie du double hybride en levures puis validée à l'aide d'un test de complémentation en cellules de mammifère (HT-GPCA, High-Throughput Gaussia Princeps Complementation Assay).

Grâce à ces deux techniques nous avons mis en évidence diverses interactions entre l'oncogène sT (small T) et des protéines cellulaires impliquées notamment dans le cycle cellulaire ou encore de la voie NFκB. Par ailleurs nous avons identifié une interaction entre cet antigène et la protéine phosphatase PP2A, connue pour son implication dans des voies de signalisation oncogéniques, ainsi qu'avec l'oncogène LT (Large T). L'effet biologique de ces interactions sur les voies de signalisation est en cours de caractérisation.

Ces résultats pourront nous permettre de comprendre la biologie du virus et les étapes de l'oncogenèse viro-induite, afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

Mots-clefs : Carcinome à cellules de Merkel – Virhostome - Thérapeutique

## **Type I IFN priming modulates pro-inflammatory response to *E. coli* LPS in chicken macrophages**

Damien Garrido<sup>1</sup>, Adrien Lion<sup>1</sup>, Bernd Kaspers<sup>2</sup>, Sascha Trapp<sup>1</sup>, Catherine Schouler<sup>1</sup>, Rodrigo Guabiraba<sup>1</sup>

1. ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, Nouzilly, France

2. Institut for Animal Physiology, University of Munich, Germany

Type I interferons (IFNs) are largely produced during host immune response to influenza virus infection. However, this strong antiviral response mediated by type I IFNs has been associated to enhanced susceptibility to bacterial superinfection in mammals. In poultry farms, low pathogenic avian influenza virus (LPAI) infection is characterized by a subclinical disease in which its occurrence and pathological consequences are greatly underestimated. Avian colibacillosis is caused by particular *E. coli* strains and represents the most common bacterial disease in poultry. It remains elusive whether LPAI-derived type I IFN production could impact chicken immune response to colibacillosis. Macrophages are tissue-resident phagocytes that respond to both viral and bacterial infection to provide efficient host-response and pathogen clearance. We therefore investigated the effects of IFN $\alpha$  priming on the outcome of LPS challenge in a chicken macrophage cell line (HD11). HD11 were primed with chIFN $\alpha$  (16h) followed by *E.coli* LPS stimulation (6h) to mimic bacteria. IFN $\alpha$ -priming had little effect on activation markers such as MHC-II or CD40. Also, it did not interfere on macrophage phagocytosis of zymosan-beads. However, IFN $\alpha$ -priming significantly boosted LPS-induced ROS production and iNOS/NO, IL1 $\beta$ , SOCS1 and notably IFN $\beta$  gene expression. Upregulation of IFN $\beta$  expression was confirmed at protein level using a bioassay. Interestingly, neutralization of IFN $\beta$  with an antiserum limited IFN $\alpha$ -priming effects on LPS-induced gene expression, therefore placing IFN $\beta$  production in the present system as a key regulatory mechanism. We therefore suggest that type I IFNs response would exacerbate macrophage pro-inflammatory response to bacterial endotoxin in chickens partly through IFN $\beta$  upregulation.

Thème : Inflammation

Mots-clés : chicken, interferon, macrophage, superinfection

## **Les Fibroblastes Cardiaques activés par l'Ischémie-Reperfusion sécrètent des cytokines modifiant le phénotype des cellules dendritiques**

LEFORT Claudie<sup>1</sup>, BENOIST Lauriane<sup>1</sup>, CHADET Stéphanie<sup>1</sup>, BABUTY Dominique<sup>2</sup>, BARON Christophe<sup>1</sup>, IVANES Fabrice<sup>1,2</sup>, ANGOULVANT Denis<sup>1,2</sup>

1. EA4245 Cellules Dendritiques et Greffes, UFR de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 TOURS

2. Service de Cardiologie, CHU Trousseau, 37044 TOURS CEDEX

En transplantation cardiaque comme après un infarctus, la reperfusion induit des lésions qui s'ajoutent à celles liées à l'ischémie. Un processus de remodelage tissulaire s'en suit dans lequel une prolifération excessive des fibroblastes, cellules de soutien, peut mener à la fibrose. Ces cellules participent également aux réponses immuno-inflammatoires observées suite à l'ischémie/reperfusion (I/R). Notre objectif est d'étudier l'impact de l'activation des fibroblastes cardiaques soumis à une I/R sur le phénotype des cellules de l'immunité innée environnantes, plus particulièrement des cellules dendritiques, principaux déclencheurs de la réponse immunitaire. Nous avons utilisé des fibroblastes cardiaques ventriculaires humains (HCF-av #6310, ScienCell). Ces cellules ont été soumises à une ischémie simulée (1% O<sub>2</sub>, PBS) pendant 5h, suivie d'une reperfusion de 24h à 3 jours (21% O<sub>2</sub>, DMEM). L'augmentation de la prolifération des fibroblastes en I/R par rapport au groupe contrôle (évaluée par un test MTT) valide notre modèle. En fin de reperfusion, le surnageant (sécrétome) récupéré et analysé par méthode ELISA montre une augmentation de la sécrétion d'IL6 et une diminution de la sécrétion de TNF $\alpha$  et IL10 en I/R par rapport au groupe contrôle. Des cellules dendritiques dérivées de monocytes ont été cultivées pendant 48h dans ce sécrétome de cardiofibroblastes (soumis ou non à la séquence d'I/R), et leur maturation analysée en cytométrie en flux. Le sécrétome de fibroblastes I/R augmente l'expression des marqueurs CD83, CD25 et CD86 des cellules dendritiques, témoignant d'un passage du phénotype immature vers un phénotype mature. Ces résultats démontrent un lien paracrine entre cardiofibroblastes et cellules dendritiques après ischémie/reperfusion. Ils suggèrent un rôle important des fibroblastes dans la genèse des réponses immuno-inflammatoires déclenchées par la reperfusion du myocarde ce qui pourrait en faire une cible privilégiée pour la cardioprotection.

## A capture-and-release purification strategy to simplify the synthesis of disulfide-rich peptides

A. Casas, M. Galibert, A. F. Delmas and V. Aucagne

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Orléans, France – alba.casas@cnrs-orleans.fr

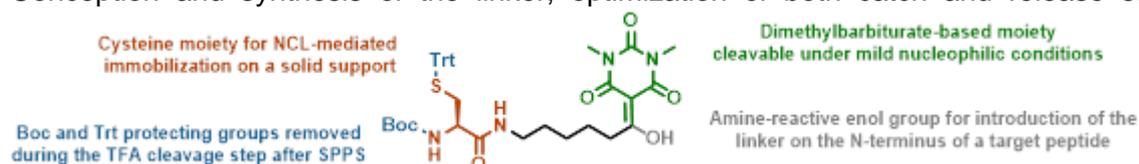
Disulfide rich peptides are highly constrained peptides benefiting from a stable 3D structure. Their backbone conformations confer them resistance against proteases, and they can bind to a wide number of therapeutically-relevant target, so they are considered as promising drugs candidates (1).

However, their chemical synthesis is strongly limited by time-consuming and complex HPLC purifications leading to low yields, especially for long ones (> 40 aminoacids).

We previously developed trifunctional N-terminal linkers as “chemical tags” that can be used for the non-chromatographic catch-and-release purification of synthetic peptides. These linkers can be selectively introduced on the target peptide, leaving unreacted the truncated acetylated peptides which are the main co-products of solid phase peptide synthesis (SPPS). After deprotection and cleavage from the resin, the target peptide is immobilized on a second solid support through a chemoselective ligation reaction. A simple filtration step then removes truncated peptides. Cleavage of the linker finally releases the purified peptide into solution.

Previous linkers we developed involved ligation and cleavage reactions difficultly compatible with unprotected cysteines (2). We report herein a novel linker (figure) compatible with cysteine-rich peptides, making use of the native chemical ligation (NCL) reaction for the immobilization step.

Conception and synthesis of the linker, optimization of both catch and release steps, and



application to biologically-relevant targets will be presented. This work also paves the way to an application to the synthesis of longer proteins, through multiple successive solid supported NCLs.

### References

- (1) Góngora-Benítez, M. et al. *Chem. Rev.* 2014, 114, 90–926.  
 (2) a) Aucagne, V. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 11320–11324. b) Galibert, M. et al. *Chem. Sci.* 2015, 6, 3617–3623.

**Thème:** Peptide synthesis - Organic chemistry

**Mots clefs:** disulfide-rich peptides, N-terminal linker, catch-and-release purification, NCL

## **Ciblage de facteurs de transcription oncogéniques par un leurre moléculaire à ADN et un ARN interférent vectorisés par des lipopolyplexes**

Geoffrey CASAS, Patrick BARIL, Chantal PICHON, Patrick MIDOUX, Jean-Marc MALINGE

Centre de biophysique moléculaire, CNRS UPR4301, Rue Charles Sadron CS 80054 45071 Orléans cedex 02, France

Les leures moléculaires à ADN et les ARN interférents sont des oligonucléotides prometteurs dans le traitement du cancer mais des obstacles limitent encore leur efficacité. Une meilleure biostabilité et la capacité d'un ciblage multiple pourraient augmenter leur activité et diminuer l'apparition de résistance au traitement.

Nous avons conçu un nouveau leurre moléculaire sous forme de minicercle d'ADN double brin (<250 pb) pour permettre le piégeage de plusieurs facteurs de transcription oncogéniques et pour augmenter la biostabilité du leurre. Un minicercle de 95 paires de base contenant 2 séquences de reconnaissance du facteur de transcription NF-κB lie efficacement 2 protéines NF-κB in vitro et inhibe l'activité transcriptionnelle de NF-κB in cellulo. Nous développons aussi une approche consistant à co-délivrer un oligonucléotide ADN linéaire leurre moléculaire et un oligonucléotide siRNA encapsulés dans la même nanoparticule, ciblant tous les deux le même facteur de transcription oncogénique Stat3 au niveau pré- et post-transcriptionnel, respectivement. Des lipopolyplexes sont utilisés pour co-encapsuler les deux oligonucléotides; ils sont composés d'un polymère cationique, le PTG1 et de liposomes cationiques (lipide100). La combinaison par co-encapsulation permet de doubler l'activité cytotoxique des deux oligonucléotides sur des cellules cancéreuses par rapport aux oligonucléotides utilisés seuls.

Thème : oligonucléotides à visée thérapeutique et vectorisation chimique.

Mots clés : Cancer, leurre moléculaire, siRNA, Stat3.

## Gènes de l'Autophagie : marqueurs sanguins potentiels de la Maladie de Parkinson

Saïd EL HADDAD<sup>1</sup>, Amandine SERRANO<sup>1</sup>, Canan OZSANCAK<sup>2</sup>, Pascal AUZOU<sup>2</sup>, Frédéric MOAL<sup>3</sup>, Antoine VALERY<sup>4</sup>, Martine DUBOIS<sup>1</sup>, Thierry NORMAND<sup>1</sup>, Stéphane CHARPENTIER<sup>1</sup>, Fabienne BRULE<sup>1</sup>, Lucile MOLLET<sup>1</sup>, Alain LEGRAND<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CBM CNRS UPR-4301-Orléans, <sup>2</sup>Service de neurologie et unité neurovasculaire, CHR Orléans, <sup>3</sup>LIFO Bat. 31A, Université d'Orléans, <sup>4</sup>Département d'information médicale, CHR Orléans.

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative du système nerveux central. Elle correspond à une perte de neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. Elle se caractérise, d'un point de vue physiopathologique, par la formation de corps d'inclusions appelés corps de Lewy. L' $\alpha$ -Synucléine (gène *SNCA*), protéine majeure impliquée dans cette maladie, s'agrège dans les neurones dopaminergiques. Cette protéine est un composant principal des corps de Lewy qui sont associés à différents dysfonctionnements cellulaires : stress oxydatif, perturbations mitochondriales et perturbation des mécanismes de recyclage et de dégradations cellulaires tels que l'autophagie. C'est une pathologie asymptomatique durant de nombreuses années (10 à 15 ans). La recherche de marqueurs précoces par un test simple, peu coûteux et non-invasif représente un challenge pour le diagnostic. Des études d'expression génique ont montré que les cellules du sang périphérique présentent des variations transcriptionnelles similaires à celles qui se produisent dans les neurones de patients. La recherche à partir de sang périphérique de marqueurs de la MP constitue donc une voie intéressante. Considérant que l'autophagie est perturbée au cours de la MP, nous avons entrepris de mesurer les niveaux d'expression de différents gènes d'autophagie dans des cellules sanguines de patients (n=37) et de donneurs sains (n=40). La technique utilisée est la « droplet digital PCR », méthode la plus sensible actuellement qui permet une quantification absolue du nombre de transcrits. Les résultats montrent une surexpression de différents gènes liés à la macroautophagie chez les malades, notamment des gènes *LC3B*, *GABARAP* et *p62*. A l'inverse, l'expression des gènes *HSC70* et *GAPDH*, respectivement associés à l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) et à la mitophagie, est réduite chez les patients. Ces résultats pourraient constituer des pistes prometteuses pour la caractérisation de marqueurs pronostics de la MP.

**Mots clés** : Parkinson, autophagie, droplet digital PCR, marqueurs sanguins

## Une exposition périnatale au Bisphénol A dichloré altère la composition lipidique hépatique chez la souris

EL HAMRANI Dounia<sup>1</sup>, CHEPIED Amandine<sup>2</sup>, MEME William<sup>1</sup>, MESNIL Marc<sup>2</sup>, DEFAMIE Norah<sup>2</sup>, MEME Sandra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire CNRS-UPR4301 (Orléans); <sup>2</sup>Signalisation et Transport Ionique Membranaire CNRS-ERL7368 (Poitiers)

Le Bisphénol A (BPA) est présent ubiquitairement dans l'environnement, ainsi l'exposition chronique de la population à ce xénoestrogène pose un problème majeur de santé publique. Lors de la désinfection de l'eau potable par l'hypochlorite, des dérivés chlorés du BPA peuvent être générés [1]. Ces derniers présentent une affinité plus importante aux récepteurs œstrogéniques [2]. Récemment, Il a été proposé que les perturbateurs endocriniens favorisent l'incidence des maladies métaboliques (obésité, insulino-résistance, diabète de type 2) [3]. Dans notre étude, nous avons évalué les effets d'une exposition périnatale au BPA dichloré (DC-BPA; un mélange de 3,3'-DichloroBPA et 3,5-DichloroBPA) sur le foie de souris par Spectroscopie et Imagerie par Résonance Magnétique du proton *in vivo* (<sup>1</sup>H SRM et IRM) et par histologie. Pendant la gestation et la lactation, des souris gravides ont reçu des injections intrapéritonéales soit du véhicule contrôle (huile de tournesol), soit 20µg/kg/jour de BPA ou DC-BPA. La descendance Mâle (M) et Femelle (F) sont séparés en 6 groupes: M Contrôle; F Contrôle; M BPA; F BPA; M DC-BPA et F DC-BPA. A 6 semaines, les acquisitions IRM et SRM ont été réalisées sur un aimant horizontal 7 Tesla (70/16 Bruker Pharmascan). La SRM du lobe hépatique droit a montré que les acides gras insaturés total (AGIT) et les acides gras polyinsaturés (AGPI) ont augmenté significativement chez les M DC-BPA et F DC-BPA, mais pas dans les groupes BPA. L'analyse en composante principale des paramètres de texture (variance, contraste, homogénéité...) des images IRM n'ont montré aucune modification structurale du foie avec les traitements DC-BPA et BPA. A 8 semaines, l'histologie du lobe hépatique droit (coloration à l'huile rouge) a mis en évidence une hausse (x100) des gouttelettes lipidiques/cm<sup>2</sup> chez les M BPA comparé aux M CTR, mais pas chez les M DC-BPA. Aucune modification histologique n'a été observée chez les F BPA et F DC-BPA. Nous avons montré qu'une exposition pendant la gestation et la lactation au DC-BPA à une faible dose (inférieure à la dose journalière tolérable du BPA: 50µg/kg/jour) induit des altérations de la composition lipidique chez des jeunes souris mâles et femelles mais n'induit pas de stéatose hépatique selon les données structurales et histologiques. Ces perturbations précoces de la composition des acides gras hépatiques chez la descendance exposés au DC-BPA pourraient conduire à des troubles plus tard à l'âge adulte.

### Références:

[1] J.-Y. Hu et al, Environ. Sci. Technol., 2002, [2] H. Takemura et al, Toxicology, 2005, [3] N. Chevalier and P. Fénichel, Diabetes Metab., 2015.

Thème : Santé, Environnement, Toxicologie

Mots-clés : BPA; BPA dichlorés; Foie; lipides; IRM; SRM.

Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016

## **Analyse métagénomique du mécanisme de discrimination entre les transcrits codants et non-codants par la machinerie de dégradation de l'ARN**

Kévin MOREAU, Aurélia LE DANTEC, Christine MOSRIN-HUAMAN et A. Rachid RAHMOUNI  
CNRS UPR4301, centre de biophysique nucléaire

Lors de la transcription, les ARN messagers (mRNAs) naissants vont être recouverts de facteurs protéiques diverses afin de les maturer et de les empaqueter pour qu'ils puissent être exportés vers le cytoplasme, sous forme de particule ribonucléoprotéiques (mRNPs) dans le but d'y être traduits. Les diverses étapes de la biogénèse de ces mRNPs sont soumises au monitoring stricte du système de contrôle qualité, sensible à tous problèmes de maturations et/ou d'empaquetage. Afin d'étudier ce système, l'équipe a développé un outil qui consiste à exprimer l'hélicase translocase bactérienne Rho dans la levure. La présence de Rho dans le noyau de la levure va avoir pour effet de dépléter certains transcrits des facteurs protéiques qui les recouvrent, et ainsi les rendre substrats pour la machinerie de dégradation des ARNs (exosome) permettant l'étude de cette dernière dans différents contextes génétiques (déplétion de certains facteurs de l'exosome). Le projet de thèse présente deux penchants, le premier est l'extension à l'échelle transcriptomique (étude via séquençage haut débit) des observations faites par l'équipe sur quelques transcrits modèles. Le second est la transposition du système de perturbation de la biogénèse des mRNPs via Rho aux cellules de mammifères (HEK293 & HeLa). Ces deux penchants sont, donc, dans la lignée d'une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle qualité et dégradations des ARNs, mais également vont contribuer à essayer de mieux comprendre le comportement d'une classe nouvelle, et, encore mal comprise : les longs ARNs non-codants (lncRNAs).

Thème : Biologie moléculaire, biologie cellulaire, bio-informatique

Mots-clés : RNA-seq, exosome, contrôle qualité des ARNs, lncRNA, Rho

## Analyse des terminateurs Rho-dépendant bactériens

Cédric Nadiras, Eric Eveno, Annie Schwartz, et Marc Boudvillain

Centre de biophysique Moléculaire, CNRS UPR4 301, rue Charles Sadron, Orléans, France

Le facteur Rho gouverne l'une des deux voies principales de terminaison de la transcription chez les bactéries. Être capable de prédire l'emplacement et l'efficacité des terminateurs Rho-dépendants dans les génomes bactériens constituerait une étape importante pour mieux comprendre ce processus de régulation génique. Bien que les déterminants de la terminaison Rho-dépendante soient mal compris, il est généralement admis que Rho se fixe au transcrit naissant au niveau d'un site *Rut* (Rho utilisation) en amont du site de terminaison. Nous combinons des approches de biochimie et de bio-informatique pour tenter de définir les caractéristiques de ces sites *Rut* et pour développer un algorithme capable de détecter dans un génome entier les terminateurs Rho-dépendants. Pour cela, nous scannons systématiquement, dans les génomes bactériens, les régions qui sont, respectivement, riches et pauvres en C et G ("bulles" C>G), une caractéristique que certaines études ont lié à la terminaison Rho-dépendante. Puis nous cherchons systématiquement les expressions régulières ayant la forme  $([T/C] C-N_{10-13})_{3-6}$  qui, d'après les structures cristallines de complexes Rho:ligand, encoderaient des sites d'interaction ARN optimaux. Nous définissons des « descripteurs » numériques pour les "bulles" C>G et les expressions régulières (longueur, composition, etc.). Nous recherchons les corrélations existant entre ces descripteurs et l'observation de terminaison Rho-dépendante pour un ensemble de séquences génomiques représentatives.

Thème : Régulations géniques bactériennes.

Mots-clés : ARN, transcription, terminaison, Rho

## Galactofuranosyltransferases of Leishmania: Novel therapeutic targets

Jihen ATI(1), Pierre LAFITE (1), Richard DANIELLOU(1)

1: ICOA UMR 7311 CNRS, Université d'Orléans

Leishmania parasite expresses abundant glycoconjugates on their surface such as Lipophosphoglycan (LPG) and glycosylinositolphospholipids (GIPLs). Both play crucial role for parasite virulence and survival.<sup>2</sup> These glycoconjugates contain in their core Galactofuranose (Gal $f$ ), which is highly immunogenic and found in many pathogenic species.<sup>2</sup> Consequently, galactofuranosyltransferases (Gal $f$ T) raised our interest. Indeed, this enzyme catalyzes the addition of Gal $f$  to LPG or GIPLs structure. Then, the main goal of this research is to express and characterize their enzymes, to gain knowledge about its biological function and implication in leishmaniasis. Four putative genes (*lpg1*, *lpg1G*, *lpg1L*, *lpg1R*) coding for Gal $f$ T identified from *L.major* genome were expressed in prokaryotic (*E.coli*) and eukaryotic organism (*L.tarentolae*). Different expression plasmids were used to allow the easy IMAC purification. Also, eukaryotic expression will allow to study of the impact of glycosylation on the activity and stability of Gal $f$ T. Interestingly, not only UDP-Gal $f$  proved to be substrate of LPG1G expressed in *L.tarentolae* but also other UDP-Pyranoside donors. To conclude, these encouraging results could be the beginning of the identification of new therapeutic targets for leishmaniasis.

### References

1. Favila, M.A., et al., Differential Impact of LPG-and PG-Deficient Leishmania major Mutants on the Immune Response of Human Dendritic Cells. PLoS Negl Trop Dis, 2015. 9(12): p. e0004238.
2. Kleczka, B., et al., Targeted gene deletion of Leishmania major UDP-galactopyranose mutase leads to attenuated virulence. J Biol Chem, 2007. 282(14): p. 10498-505.

## Monitoring of colorectal cancer by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of urinary nucleoside biomarkers

M.G. Ayari,<sup>1</sup> A. Krstulja,<sup>1</sup> P. Favetta,<sup>1</sup> P. Manesiotis,<sup>2</sup> A. J. Hall,<sup>3</sup> L. A. Agrofoglio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Orleans, CNRS, I.C.O.A., UMR CNRS-7311, 45067 Orléans, France

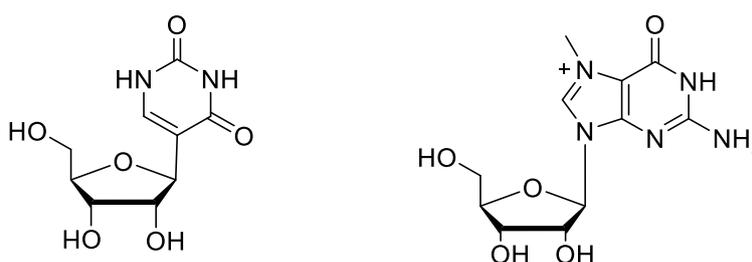
<sup>2</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Queen's Univ. Belfast - BT9 5AG, Belfast

<sup>3</sup>Medway School of Pharmacy, Univ. Greenwich & Kent, Chatham, Kent, ME4 4TB, UK

Nucleosides are the degradation products of nucleic acids. They are present in the urine of cancer patients and their modified analogues (especially pseudouridine and *N*7-methylguanosine) have been reported as potential biomarkers. We aim to develop water-compatible MIPs prepared by a “dummy template” and non-covalent approach, focusing mostly on the polymer quality in formulation (rigidity, stability and repeatability).

Using 2',3',5'-tri-*O*-acetylated nucleosides as “dummy templates”, we developed selective MIPs for the recognition of pseudouridine and *N*7-methylguanosine, respectively.

For pseudouridine imprinting, a “tailored-made” monomer, 2-*tert*-butyl-*N,N'*-bis-(5-vinylpyridin-2-yl)-isophthalamide, was used.<sup>3</sup> Chromatographic methods like HPLC retention and frontal analysis were used for determining the binding capacity of synthesized polymers and their behaviour in synthetic urine. Finally, MISPE was developed and applied to the extraction of these nucleosides from urine.



Pseudouridine (1) and *N*7-Methylguanosine (2)  
two urinary nucleosides, biomarkers of colorectal cancer

**Mots clefs:** Nucleosides, MIPs, pseudouridine, dummy templates, MISPE.

## Oxyazidation d'énamides catalysée au fer

Sylvain Bertho,<sup>1</sup> Romain Rey-Rodriguez,<sup>1</sup> et Isabelle Gillaizeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR CNRS 7311, Université d'Orléans, 45100 Orléans, France

L'intérêt croissant à développer de petites molécules diverses et originales possédant des propriétés thérapeutiques ainsi que la nécessité de comprendre les mécanismes biologiques décrivent le besoin croissant de développer continuellement et de façon effective de nouvelles méthodologies de synthèse.

Afin d'élargir l'espace chimique des composés hétérocycliques azotés et dans une démarche plus éco-compatible, nous nous intéressons au développement de nouvelles méthodes de fonctionnalisation directe de liaison C-H d'énamides catalysées par le fer.

Ce travail porte sur l'oxyazidation d'énamides qui permet une difonctionnalisation totalement régiosélective avec une excellente économie d'atomes. Les structures obtenues peuvent être post-fonctionnalisées par couplage organométallique afin d'accéder à des structures plus complexes.

Thème : méthodologie de synthèse en chimie organique

Mots-clés : catalyse, fer, énamides, azidation

## Étude par simulations de dynamique moléculaire de la cinétique du processus d'association récepteur-ligand

Abdenmour Braka <sup>1,2</sup>, Samia Aci-Sèche <sup>1</sup>, Stéphane Bourg <sup>1,2</sup>, Norbert Garnier <sup>2</sup>, Pascal Bonnet <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Université d'Orléans, CNRS, UMR 7311, 45067 Orléans, France.

<sup>2</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR 4301, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France.

Malgré les progrès d'optimisation des ligands grâce aux relations structure-affinité/activité (SAR), de nombreux candidats médicaments échouent encore aux essais cliniques en raison de leur faible efficacité. L'évaluation de la cinétique des ligands permet de mieux en estimer l'efficacité et la sécurité. Aujourd'hui, les relations structure-cinétique (SKR) semblent montrer un intérêt majeur pour la découverte de médicaments notamment au stade précoce lors de l'optimisation des touches (hits). Compte tenu de cet intérêt croissant des SKR, nous développons une nouvelle méthodologie pour comprendre le mécanisme de l'association d'un ligand avec sa cible biologique et de prédire ses constantes cinétiques.

La simulation du processus d'association a été réalisée grâce à deux méthodes de dynamique moléculaire sur un complexe ligand-protéine kinase. Tout d'abord, nous utilisons la dynamique brownienne (BD) pour simuler la diffusion et le rapprochement du ligand vers sa cible pour détecter les bassins d'attraction à la surface du récepteur. Ensuite, nous utilisons la dynamique moléculaire dirigée adaptative (ASMD) pour simuler l'entrée du ligand dans le site actif à partir du bassin le plus peuplé. La combinaison de ces deux méthodes nous a permis de reproduire le processus d'association avec une bonne prédiction de la position finale et de l'orientation du ligand dans le site actif comparées à celles de la structure cristallographique du complexe.

## Design, synthesis and biological evaluation of LIMK inhibitors

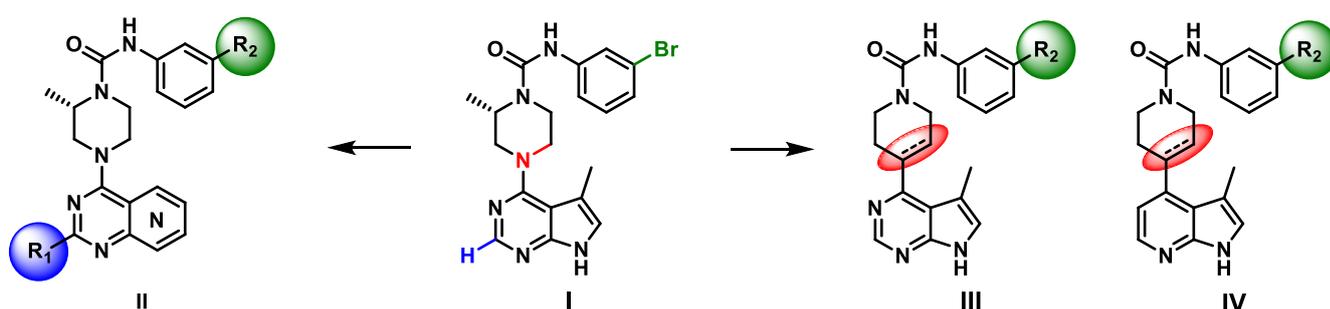
Anthony Champiré, Karen Plé, Sylvain Routier

Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans, France

Nitrogen heterocycles are a well-known class of molecules with a high potential in medicinal chemistry.<sup>(a)</sup> Indeed they have been studied for their properties against several diseases such as cancer, hepatitis or neurodegenerative disorders. Neurofibromatosis is a disease which touches 1 in 3500 people worldwide. LIM-Kinase has been shown to be involved in the signaling pathway of this pathology, and its inhibition is a promising therapeutic target.<sup>(b)</sup> As part of a project to develop new molecules for LIMK inhibition, we wished use our synthetic experience in the synthesis of nitrogen containing heterocycles.

Starting from the structure of **I**, one of the most efficient inhibitors of LIMK<sup>(c)</sup>, we have designed new series of molecules to improve the SAR. We first wanted to determine the importance of the position of the hydrogen donor-acceptor essential for hinge binding. For this purpose, we developed a small library of pyridopyrimidine derivatives **II** with the hydrogen donor acceptor in different positions or totally absent from the molecule. Secondly we synthesized several pyrrolopyrimidine and azaindole analogs **III** and **IV** replacing the central piperazine by a piperidine or a 1,2,3,6-tetrahydropiperidine to determine its influence on the activity.

To date, several new libraries of original pyridopyrimidines **II**, pyrrolopyrimidines **III** and azaindoles **IV** have been synthesized and tested on a kinase panel including LIMK2. These first results are encouraging and resulted in the synthesis of new molecules which are currently being tested. Finally, new modulations are in progress to target ROCK, an other kinase deregulated in patients affected by neurofibromatosis.



<sup>(a)</sup> Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 10257-10274.

<sup>(b)</sup> Petrilli, A.; Copik, A.; Posadas, M.; Chang, L.S.; Welling, D.B.; Giovannini, M.; Fernández-Valle C. LIM domain kinases as potential therapeutic targets for neurofibromatosis type 2. *Oncogene*, **2014**, 33(27), 3571-3582.

<sup>(c)</sup> Harrison, B. A. *et al.* Novel Class of LIM-Kinase 2 Inhibitors for the Treatment of Ocular Hypertension and Associated Glaucoma. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6515-6518.

Thème : Medicinal chemistry

Mots-clés : Neurofibromatosis, nitrogen heterocycles, LIMK inhibitors

## Synthèse convergente de composés 1,3,5-triazine-2,4,6-trisubstitué ciblant les cystéine cathepsins K & S

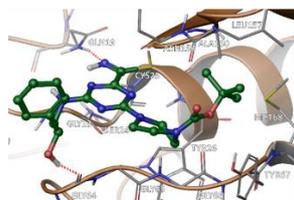
Elzbieta Plebanek<sup>(1)</sup>, Florian Chevrier<sup>(1)</sup>, Vincent Roy<sup>(1)</sup>, Thibault Garenne<sup>(2)</sup>, Fabien Lecaille<sup>(2)</sup>, Dawid Warszycki<sup>(3)</sup>, Andrzej J. Bojarski<sup>(3)</sup>, Gilles Lalmanach<sup>(2)</sup>, Luigi A. Agrofoglio<sup>(2)</sup>

1) Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

2) INSERM, UMR 1100, Pathologie Respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies respiratoires, Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France

3) Medicinal Chemistry Department, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland

La synthèse et l'évaluation biologique contre différentes cathepsines à cystéine possédant des activités endopeptidiques, de 2 nouvelles familles de composés *hitherto* portant le noyau 1,3,5-triazine, substitués par une fonction nitrile et soit d'un groupement cyclohexylamine ou d'un groupement pipérazine, sont décrits. La relation structure-activité a été traitée : parmi les 16 nouveaux composés synthétisés, le lead **8h** est le plus actif et inhibe sélectivement CatK ( $IC_{50} = 28$  nM) et CatS ( $IC_{50} = 23$  nM). Le docking moléculaire du lead **8h** aux structures cristallographiques des Cathepsines K et S a confirmé la présence d'un mode de liaison commun à tous les composés par la formation d'une liaison covalente avec la Cys25. Ainsi, ces résultats indiquent que ces nouveaux analogues peuvent être de puissants agents antiviraux pour les virus nécessitant que leurs glycoprotéines membranaires soit clivées par des protéases, ainsi permettant leurs entrées dans la cellule hôte.



## **Frag2Drugs: A new tool to design new kinase inhibitors from fragments**

José-Manuel Gally, Jean-Thomas Heinrich, Alan Obled, Samia Aci-Sèche, Pascal Bonnet

Bioinformatique Structurale et Chémoinformatique, Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA),  
UMR CNRS-Université d'Orléans 7311, Université d'Orléans BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France

During the past decade, the Fragment-Based Drug Design (FBDD) approach has been successful in identifying promising compounds for drug research and development. The first kinase-targeted drug approved by the FDA and originated from FBDD is vemurafenib (2011) targeting unresectable or metastatic melanoma for patients bearing BRAF V600E mutation. Since then, FBDD has been extensively studied and is currently applied in many drug discovery projects.

Fragments, small molecules with low molecular weight (<300Da) and flexibility, bind weakly to the receptor but form more efficient interactions in comparison to hits identified by HTS. By linking multiple specific fragments together within the active site of a protein kinase, we foresee designing potent and selective promising inhibitors. We present here a new *in silico* FBDD tool, Frag2Drugs, that combines both structural information of the fragments within the binding site of protein kinases and their corresponding predicted binding affinity. We validated this tool by identifying known kinase inhibitors.

## Formation d'oxazolones à partir d'ynamides en présence de sels de Zn

L. Habert, R. Sallio, I. Gillaizeau

Institut de Chimie Organique et Analytique, ICOA, UMR CNRS 7311, Université d'Orléans, rue de Chartres,  
45100 Orléans, France

Compte tenu de l'omniprésence des hétérocycles azotés dans de nombreux produits bioactifs, le développement de méthodologies efficaces pour y accéder et les fonctionnaliser constitue un objectif majeur en chimie. Les ynamides représentent des châssis moléculaires intéressants offrant la possibilité d'accéder à des hétérocycles azotés tels que les oxazolones, structures privilégiées d'intérêt en chimie médicinale. Depuis quelques d'années, différentes stratégies ont été décrites dans la littérature pour la formation d'oxazolone 3-5 disubstituées. Elles utilisent principalement des catalyseurs métalliques coûteux tels que le palladium ou l'or. Récemment, nous avons porté notre attention sur l'obtention d'énamides à partir d'ynamides en présence du couple zinc-cobalt, métaux peu coûteux et non toxiques. Au cours de cette communication, nous détaillerons nos résultats innovants obtenus lors de la formation d'oxazolone à partir d'ynamides en utilisant des sels de zinc.

Thème : synthèse organique

Mots-clés : ynamide , oxazolone , sels de zinc

## Amination de liaisons C – H d'énamides via une catalyse au rhodium

Jestin Grégory,<sup>[a]</sup> Rey Rodriguez Romain,<sup>[a]</sup> Manguin Romane,<sup>[a]</sup> Darses Benjamin,<sup>[b]</sup> Dauban Philippe,<sup>[b]</sup> Gillaizeau Isabelle<sup>[a]</sup>

[a] Institut de Chimie Organique et Analytique UMR 7311 CNRS, Pôle de chimie, Université d'Orléans, rue de Chartres, 45100 Orléans, France.

[b] Centre de Recherche de Gif-sur-Yvette, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301 CNRS Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, France.

Les nouvelles méthodes d'amination constituent des voies d'accès importantes en synthèse organique car elles permettent l'accès à de nombreux composés azotés. En effet, l'azote est ubiquitaire dans de nombreuses substances naturelles et médicaments et joue un rôle fondamental dans la pharmacomodulation de plusieurs produits bioactifs.

Lors de cette communication, nous allons étudier la réactivité des énamides vis-à-vis des transferts catalytiques de nitrènes *via* la réaction d'oxyamidation. Par l'intermédiaire de cette méthode, nous pouvons envisager l'introduction simultanée d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote sur nos composés avec une diastéréosélectivité intéressante. Les synthons difonctionnalisés ainsi obtenus nous permettent la mise en œuvre d'un large éventail de réactions par post-fonctionnalisation afin de synthétiser des composés diazotés polyfonctionnalisés, notamment par l'introduction de divers nucléophiles en alpha de l'azote endocyclique. En particulier, l'oxyamidation d'endo-énamides permet d'aboutir à des composés bicycliques par cyclisation en milieu acide.

Thème : méthodologie en catalyse métallique

Mots-clés : Enamide, oxyamidation, catalyse, rhodium, nitrène, cyclisation

## **Altération des modifications post-traductionnelles du cytosquelette par un herbicide organophosphoré, le glufosinate d'ammonium**

Justyne FEAT, Géraldine DILHET, Arnaud Pâris, Céline DUBOURG, Stéphane MORTAUD

CNRS Orléans, UMR 7355, Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires (INEM)

Les microtubules (MTs) forment un réseau intracellulaire dynamique essentiel au développement et au fonctionnement des cellules. Les MTs, hétérodimères d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubulines, sont hétérogènes de par la présence d'isotypes de tubulines et par l'ajout de différentes modifications post-traductionnelles. La polyglutamylation est une modification post-traductionnelle correspondant à l'ajout et au retrait enzymatique de résidus glutamatergiques à l'extrémité C-terminale de la tubuline. Ce mécanisme, rapide et réversible, régule l'interaction de nombreuses protéines structurales et motrices avec les MTs. La polyglutamylation est prédominante dans les neurones, au niveau des cils et des centrosomes. Ainsi une perturbation de ce phénomène conduit à des modifications cellulaires importantes pouvant être à l'origine de maladies neurodégénératives. Le glufosinate d'ammonium ou la phosphinothricine (PPT) est le composé actif d'un herbicide organophosphoré largement utilisé en agriculture. La PPT et son principal métabolite (PPTO) sont des analogues structuraux du glutamate. Dans cette étude, nous nous intéressons à l'impact de ces deux molécules sur un modèle *in vitro* de différenciation à partir de cellules souches cérébrales. Nos résultats montrent une altération de la polyglutamylation du cytosquelette et mettent en évidence un effet néfaste de la PPT et de son métabolite sur plusieurs processus cellulaires.

Thème : Neurotoxicité d'un pesticide

Mots-clés : Cytosquelette, microtubule, polyglutamylation, glutamate, herbicide, modèle cellulaire

## **IL-33/ST2 attenuates lung epithelial damage and inflammation upon ozone exposure in mice**

Chloé Michaudel<sup>1,2</sup>, Claire Mackowiak<sup>1,2</sup>, Aurélie Couturier-Maillard<sup>1,2</sup>, Julie Piotet-Morin<sup>1, 2</sup>, Isabelle Maillet<sup>1,2</sup>, Flora Reverchon<sup>1,2</sup>, Louis Fauconnier<sup>1,3</sup>, Pauline Chenuet<sup>1,3</sup>, Valérie Quesniaux<sup>1,2</sup>, Dieudonnée Togbe<sup>1,3</sup> and Bernhard Ryffel<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR7355, Orleans, France

<sup>2</sup> Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orleans, Orleans, France

<sup>3</sup> ArtImmune SAS, 13 Avenue Buffon, Orleans, France

IL-33 has been shown to play critical roles bridging innate and adaptive immunity in the regulation of tissue homeostasis, injury and repair. Whether IL-33 can regulate neutrophils recruitment and function independently to airways hyperresponsiveness (AHR) is unclear. Here, we report higher neutrophils influx in the absence of IL-33/ST2 signaling using IL-33 and ST2 deficient mice after ozone exposure. IL-33 signaling is involved in cell death, epithelial cell damage and ROS production. Blockade of IL-33 or ST2 with specific antibodies in wild type mice increased neutrophils counts and bronchial epithelial damage upon ozone exposure. Recombinant IL-33 and neutrophils depletion with anti-GR1 antibody reduced ozone induced lung inflammation. These data demonstrate that IL-33 is critical for maintaining the balance between homeostasis and inappropriate immune cell activation.

Thème : pulmonary inflammation

Mots-clés : Ozone, IL-33, ST2, ROS, epithelial damage, neutrophils

## **Impact de la nutrition azotée sur la dynamique de réponse à la sécheresse chez une espèce à croissance rapide : le peuplier**

L. Bouyer<sup>1,2</sup>, C. Vincent-Barbaroux<sup>1,2</sup>, M. Feinard-Duranceau<sup>1,2</sup>, I. Le Jan<sup>1,2</sup>, A. Delaunay<sup>1,2</sup>, S. Chamaillard<sup>1,2</sup>, H. Cochard<sup>3</sup>, T. Barigah<sup>3</sup>, F. Brignolas<sup>1,2</sup>, R. Fichot<sup>1,2</sup>

1. Université d'Orléans, EA1207 Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), Orléans

2. USC INRA 1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), Orléans

3. INRA, UMR 547 PIAF INRA-Clermont Université, Clermont Ferrand

Le nombre de dépérissements forestiers et d'évènements de mortalité a considérablement augmenté au cours des 20 dernières années sur l'ensemble du globe, la raison principale étant souvent attribuée à l'augmentation des évènements climatiques extrêmes de type sécheresse et fortes températures. La compréhension des mécanismes et l'identification des seuils physiologiques impliqués dans l'acclimatation et la résilience des arbres à la sécheresse constituent donc un enjeu scientifique majeur, notamment pour l'élaboration de modèles de prédiction du fonctionnement des écosystèmes terrestres.

Les rôles des dysfonctionnements hydrauliques et de l'épuisement des réserves carbonées dans la mortalité commencent à être bien décrits chez les arbres en réponse à la sécheresse. Cependant, d'autres contraintes abiotiques ou biotiques peuvent interagir et renforcer les effets de la sécheresse en conditions naturelles. Les effets de ces interactions restent encore très peu documentés. La disponibilité en eau et en nutriments comme l'azote sont les deux principaux facteurs limitant la productivité des forêts. Appliquées séparément, sécheresse et fertilisation azotée conduisent généralement à des réponses physiologiques antagonistes parfois difficiles à hiérarchiser.

L'expérience présentée a pour but d'évaluer dans quelle mesure le statut nutritif azoté module la dynamique de réponse à la sécheresse chez les arbres. L'étude a été réalisée à partir d'un dispositif factoriel combinant trois modalités de disponibilité en eau (contrôle, sécheresse modérée, arrêt d'arrosage) et deux modalités de fertilisation (faible dose, forte dose) sur deux variétés de peuplier contrastées pour leur contrôle stomatique. Les effets sur la croissance, sur le fonctionnement hydrique et ses limites, l'embolie, seront ici présentés. Ces données seront par la suite complétées par l'analyse des réserves carbonées et azotées dans les compartiments feuilles, tiges et racines afin d'évaluer la contribution des dysfonctionnements hydrauliques et de l'épuisement des réserves dans la dynamique de réponse.

Thème : Ecophysiologie végétale

Mots-clés : changement global, fertilisation azotée, peuplier, résistance à la sécheresse.

## **Modulation allostérique des récepteurs nicotiniques neuronaux des mammifères par les insecticides néonicotinoïdes**

Alison Cartereau<sup>1</sup>, Steeve H. Thany<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université d'Orléans, Laboratoire Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France

L'utilisation déraisonnée des produits phytosanitaires d'origine chimique a pris ces dernières années une importance considérable compte tenu du poids de l'agriculture dans l'économie mondiale, des problèmes de santé publique et environnemental posés, des polémiques autour de leurs impacts sur des organismes non cibles, et des mécanismes de résistance développés par les insectes.

Parmi les insecticides, une classe particulière, les néonicotinoïdes, est apparue ces dernières années en remplacement des organophosphorés et des carbamates. Les insecticides néonicotinoïdes agissent comme des agonistes des récepteurs nicotiniques neuronaux des insectes. Ce sont des molécules neurotoxiques car l'acétylcholine est un neurotransmetteur excitateur du système nerveux des mammifères et des insectes. Bien que plusieurs études suggèrent que ce sont des 'mauvais' agonistes des récepteurs des mammifères, en réalité très peu d'étude ont étudié le mode d'action des néonicotinoïdes sur les récepteurs neuronaux des mammifères.

Nous avons étudié l'effet de 3 insecticides néonicotinoïdes, l'acétamipride, la clothianidine et le thiaméthoxame sur le récepteur neuronal  $\alpha 7$  de mammifère. Nos travaux montrent que ces molécules agissent comme des modulateurs allostériques du récepteur  $\alpha 7$ . Cet effet allostérique n'est pas observé sur les récepteurs neuronaux des insectes. Nos résultats suggèrent que les insecticides néonicotinoïdes agiraient sur les récepteurs de mammifères non pas comme des agonistes pures mais comme des modulateurs allostériques.

Thème : Etude d'impact des insecticides néonicotinoïde sur les organismes non cible

Mots-clés : insecticides néonicotinoïde, récepteurs à l'acétylcholine, ovocyte de Xenope, rat.

## L'invasion fulgurante de la pyrale du buis en Europe : une approche phylogéographique

Audrey Bras<sup>1</sup>, Alain Roques<sup>1</sup>, Jérôme Rousselet<sup>1</sup>, Marie-Anne Auger-Rozenberg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR633 Zoologie Forestière, Orléans, France, [abras@orleans.inra.fr](mailto:abras@orleans.inra.fr)

La pyrale du buis, *Cydalima perspectalis*, a été observée pour la première fois en Allemagne en 2007. Dix ans après, ce Lépidoptère a envahi 28 pays européens et cause d'importants dégâts sur les buis ornementaux et naturels. Ce ravageur aurait été introduit via le commerce de plantes d'ornements entre les pays européens et la Chine tandis que le commerce au sein de l'Europe aurait facilité sa dispersion. Pour mieux comprendre ses voies d'invasions, des échantillons de *C. perspectalis* ont été collectés en Chine, en Corée et dans 16 pays européens envahis, puis séquencés avec le marqueur mitochondrial COI. En Asie, sur 45 individus, 6 haplotypes ont été observés en Chine et 2 en Corée. En Europe, sur 184 individus séquencés, 5 haplotypes ont été rencontrés dont 4 déjà observés en Asie. Les premiers résultats n'ont pas mis en évidence de structuration des populations dans la zone d'origine, ce qui ne permet pas de définir des zones sources potentielles avec ce marqueur. En revanche, la présence d'une diversité génétique importante en Europe associée à une structuration géographique des populations sont en faveur d'introductions multiples. Un échantillonnage plus large dans la zone d'origine associé à l'utilisation de marqueurs plus polymorphes nous aidera à préciser les voies d'invasions de *C. perspectalis* en Europe et comprendre sa rapide propagation.

Mots-clés : insecte invasif, *Cydalima perspectalis*, commerce ornemental, phylogéographie, introduction multiple

## Photoacoustic imaging of hypoxia during assessment of highly potent antitumor prodrug in mouse models of human tumors

Raes Florian<sup>1</sup>, Renoux Brigitte<sup>2</sup>, Fuchs Dieter<sup>3</sup>, Trochet Philippe<sup>3</sup>, Lerondel Stéphanie<sup>1</sup>, Papot Sébastien<sup>2</sup>, Le Pape Alain<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PHENOMIN-TAAM CIPA, CNRS UPS44, Orléans, France

<sup>2</sup>IC2MP, UMR-CNRS 7285, Poitiers, France

<sup>3</sup>FUJIFILM Visualsonics Inc., Amsterdam, The Netherlands

**Introduction:** Photoacoustic Imaging (PA) is an emerging technique that is increasingly used in the field of preclinical and clinical imaging. Considering the crucial role of hypoxia upon the chemoresistance of tumors, it becomes essential for oncopharmacology studies to precisely document the hypoxic status of tumors before then during the time course of treatments. The aim of this study was to assess the efficacy of a new antitumor prodrug (a  $\beta$ -Glucuronidase-Responsive Albumin-Binding Prodrug of MMAE) and to characterize the tumor hypoxic status before starting the treatments. Combining bioluminescence imaging (BLI) and 3D ultrasound (US) measurements allowed confrontation between tumor proliferation and tumor volumes.

**Methods:** Bioluminescent Mia-PaCa-2 human pancreatic ductal adenocarcinoma and MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma were orthotopically implanted in nude mice. Tumor proliferation was monitored by BLI using the IVIS-Lumina II system (Perkin Elmer), whereas tumor volume was monitored by 3D US using the VEVOLAZR system (FUJIFILM VisualSonics). For hypoxia assessments, tumors were investigated by PA imaging so that average values of SO<sub>2</sub> were determined and hypoxic volumes documented.

**Results:** This study demonstrates that this prodrug is significantly effective on two different hypoxic orthotopic models of human cancer as compared to the parental cytotoxic agent (MMAE). Due to its dependence towards O<sub>2</sub> and ATP, BLI signals cannot be used as a relevant proliferation biomarker at the time a tumor becomes hypoxic. This phenomenon is clearly evidenced in the vehicle group for pancreatic tumors that exhibit progressive decrease of BLI while tumors volumes are growing. For breast tumors, disturbances of BLI are more complex with a two phase process associated to a delayed peripheral tumor proliferation. However it is a unique modality to follow early stages of proliferation and to allow allocations of animals into experimental groups with equivalent tumors stages. PA imaging provides unique resource to assess the evolution of hypoxia during the time course of these tumors and brings strong support to invalidate the use of BLI for assessment of therapies in these tumor models. 3D US measurements allow achieving accurate and reproducible determination of volumes for both superficial and internal tumors.

**Conclusions:** Considering the crucial effect of hypoxia upon chemosensitivity towards antitumor drugs, the use of characterized hypoxic tumor models should allow better predictivity for translation to clinical research. PA imaging coregistrated with high resolution US measurements allows to ensure a relevant assessment of antitumor therapies on hypoxic models of human tumors.

**Mots clefs:** Tumor hypoxia, Photoacoustic imaging, Prodrug efficacy

## Bases moléculaires et évolution du mode de vie galligène dans le genre *Caloptilia*

Antoine Guiguet<sup>1,2</sup>, Carlos Lopez-Vaamonde<sup>1,3</sup>, Issei Ohshima<sup>2</sup>, David Giron<sup>1</sup>

1 Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR 7261, CNRS/Université François-Rabelais de Tours, France

2 Department of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, Sakyo, Kyoto, Japan

3 INRA, UR0633 Zoologie Forestière, F-45075 Orléans, France

Les galles de plantes induites par des arthropodes, appelées aussi zoocécidies, constituent un des exemples les plus spectaculaires de détournement de la physiologie et de l'anatomie végétale par un parasite. Au cours de l'évolution, cette capacité à manipuler profondément le développement des plantes semble être apparue de nombreuses fois dans divers ordres d'insectes. Price (1987) propose une évolution du mode de vie galligène à partir du mode de vie mineur de feuille, lui aussi endophyte mais impliquant a priori une plus faible reconfiguration du végétal. Cette dernière affirmation est cependant remise en cause par l'étude des insectes mineurs dont la reconfiguration de la plante hôte s'avère d'une complexité comparable. Quant aux causes de la formation des zoocécidies, elles restent méconnues et les effecteurs chimiques impliqués restent à identifier. Notre travail vise à éclaircir ces deux questions par l'étude d'un papillon galligène du Japon, *Caloptilia cecidophora* (Lepidoptera : Gracillariidae). Le genre *Caloptilia* est composé presque uniquement d'espèces dont la larve est mineuse. *C. cecidophora* fait figure d'exception car la chenille induit une galle foliaire après une phase mineuse. D'une part, l'élevage de cet insecte nous a permis de préciser la description de sa biologie très particulière, de même que l'étude approfondie de l'histologie des structures végétales modifiées par l'insecte. Ces résultats nous fournissent d'importantes hypothèses concernant le mode d'action de la chenille ouvrant la voie vers l'identification des effecteurs potentiellement impliqués. D'autre part, un examen de la littérature naturaliste ancienne nous a révélé l'existence probable de nouvelles espèces galligènes proches de *C. cecidophora*, ce qui a depuis été confirmé par nos observations réalisées en Asie du Sud Est. L'analyse comparative des données obtenues chez les espèces avec une stratégie mixte (galligène et mineuse) avec les espèces ayant adoptées une stratégie unique (galligène ou mineuse) vise à identifier les effecteurs impliqués dans le processus d'induction des galles. L'intégration de ces différentes espèces dans un contexte phylogénétique et leur corrélation avec la stratégie alimentaire (Mineuse vs. Galligène) vise à reconstruire l'origine évolutive du mode galligène chez les Gracillariidae, à identifier le nombre de fois où le mode de vie galligène a évolué et les conséquences de cette stratégie d'exploitation du végétal sur la diversification de cette famille d'insectes.

## Chémérine, un potentiel lien entre reproduction et métabolisme chez la poule

N.Mellouk<sup>1</sup>, C.Ramé<sup>1</sup>, M.Marchand<sup>2</sup>, C. Staub<sup>3</sup>, J.L. Touzé<sup>3</sup>, H. Rigoreau<sup>2</sup>, F. Mercierand<sup>2</sup>, J. Delaveau<sup>2</sup>, C. Rat<sup>2</sup>, A. Travel<sup>4</sup>, C. Souchet<sup>4</sup>, P. Froment<sup>1</sup>, J.Dupont<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR PRC INRA - CNRS - Université de Tours - IFCE, Equipe «Biology and Bioinformatics of Signalling Systems (BIOS)», 37380 NOUZILLY, France.<sup>2</sup>UEPEAT <sup>3</sup>UEPAO <sup>4</sup>ITAVI

Les relations entre la reproduction et la nutrition sont multiples et variées et la présence d'un surpoids chez la femme comme chez les espèces à intérêt agronomique pose souvent de nombreux problèmes de conception. Depuis quelques années, il est admis que les hormones sécrétées par le tissu adipeux pourraient participer au contrôle des fonctions reproductives et par conséquent être impliquées dans certaines infertilités. Récemment, nous avons montré que l'une de ces hormones, la chémérine, est capable de réguler à travers son récepteur, CMKLR1, non seulement l'homéostasie énergétique, mais aussi la stéroïdogénèse ovarienne chez différentes espèces (humaine et bovine) (Reverchon et al, 2012,2014). Pour mieux comprendre les mécanismes qui lient métabolisme et reproduction, nous utilisons le modèle « poule » connu pour développer des dysfonctionnements de la reproduction en réponse à l'engraissement. Notre protocole inclus des poules reproductrices type chair (n=320) nourries *ad libitum* ou de manière restreinte avec ou sans supplémentation en acide gras polyinsaturé (oméga 3) (FAS, 1%). Dans ce contexte, le régime *ad libitum* augmente l'expression de la chémérine et de ses récepteurs dans le tissu adipeux, induit une diminution de la sécrétion de stéroïdes par les cellules de la granulosa, corrélée à une baisse de la fertilité et atténuée par le traitement FAS (p<0.05)

Thème : biologie de la reproduction et métabolisme

Mots-clés : tissu adipeux, fertilité, métabolisme, poule

## The effects of docosahexaenoic acid (DHA, n-3 PUFA), during *in vitro* maturation, on bovine oocyte developmental competence

Mouhamad Oseikria, Sébastien Elis and Svetlana Uzbekova

UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

Beneficial effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) were reported on the uterine environment, ovarian activity, follicular growth and oocyte quality. We reported that the addition of a low physiological concentration (1  $\mu$ M) of DHA, when provided during (IVM) might improve oocyte developmental competence in terms of parthenogenetic activation or *in vitro* fertilization (Oseikria et al., 2016). DHA can bind to free fatty acid receptor 1 or 4, (FFAR1 and 4) thus activating their signaling pathways. Therefore the first objective was to investigate whether the FFAR4 was involved in the DHA effects on oocyte quality. We investigated the effect of a specific agonist of the FFAR4, TUG-891, on embryo development after IVF. FFAR4 is expressed in ovarian compartments at transcript level and the protein FFAR4 was localized in CC by immunohistochemistry, by using a customized antibody produced specifically against the bovine protein. After 22h IVM with or without DHA 1  $\mu$ M or TUG 1 and 5  $\mu$ M, oocytes were subjected to (IVF). At day 2, the number of embryo with more than 4 cells was significantly increased with DHA 1  $\mu$ M and TUG 1 or 5  $\mu$ M followed the same tendency. At day 7, both blastocyst and expanded blastocyst rates were significantly increased with either DHA 1  $\mu$ M or TUG 1 or 5  $\mu$ M (logistic regression,  $p < 0.05$ ). Finally, in order to decipher the pathways of DHA action on CC, transcriptome analysis (Microarray hybridization) of CC after 4h IVM in the presence or absence of 1  $\mu$ M DHA was performed. 35 genes were up-regulated and 91 were down-regulated in DHA samples. However, only 14 differentially expressed genes varied more than two-fold. Also, it should be noted that no differentially expressed gene was detected between these conditions with Benjamini-Hochberg correction analysis. The kinetic of expression of these genes and 3 additional candidate genes involved in glucose metabolism (Glut1) or oxidative stress (GPX1 and GPX4) was characterized by qRT-PCR analysis on CC samples at 0, 4, 10 and 24h IVM with or without DHA 1  $\mu$ M, TUG 1 or 5  $\mu$ M. We didn't find any significant difference between treatment for all tested genes. Altogether the IVF data suggest that DHA exert its effect partly through FFAR4 on oocyte developmental competence. In the next step, we have to focus on signaling pathways and not on transcription modification to elucidate DHA mechanisms of action as it seems that transcription modulation is not the main mechanism of action of DHA.

Mots clefs: oocyte competence – IVM - IVF - n-3 PUFA – DHA – Cumulus - RT-PCR - Microarray – FFAR4

## **A simplified duplex real-time PCR incorporating TaqMan locked nucleic acid (LNA) probes for the simultaneous quantification of *Waddlia chondrophila* and *Listeria monocytogenes* in aborted ruminant samples**

Mohamed Barkallah <sup>a</sup>, Yaakoub Gharbi <sup>a</sup>, Ahlem Ben Slima <sup>a</sup>, Fatma Elleuch <sup>a</sup>, Zouhir Mallek <sup>b</sup>, Rania Ben Saad <sup>c</sup>, Michel Gautier <sup>d</sup>, Radhouane Gdoura <sup>a</sup>, Imen Fendri <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Toxicology-Microbiology and Environmental Health Unit (UR11ES70), Faculty of Sciences, University of Sfax, Tunisia

<sup>b</sup>Veterinary Research Center of Sfax, Sfax, Tunisia

<sup>c</sup>Centre of Biotechnology of Sfax (CBS), LPAP, University of Sfax, Tunisia

<sup>d</sup>Equipe Microbiologie de l'œuf et des Ovoproduits (MICOV), Agrocampus Ouest, INRA, (UMR1253) Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, Rennes, France

*Waddlia chondrophila* and *Listeria monocytogenes* are well known emerging pathogens that cause ruminants' abortion around the world. Zoonotic infections caused by these bacteria are mostly underestimated due to difficulties of diagnosis resulting from their intracellular growth. The purpose of this study was to develop and validate a dual real-time quantitative PCR (qPCR) assay for the simultaneous quantification of *W. chondrophila* and *L. monocytogenes* in biological samples from aborted ruminants. Technical performance was examined using linear control plasmids. A total of 211 veterinary samples (15 placental tissues, 50 blood, 53 milk and 93 vaginal swab samples) were used to compare the qPCR with standard culture methods. The limit of detection was 2 plasmid template copies per reaction with approximately 5000-fold differences in concentrations of the two competing templates. Coefficients of variation for positive control plasmids were less than 1.8%. Both intra- (1.01–2.13% and 1.13–1.71%) and inter- (1.02–2.24% and 1.2–1.66%) assay variations of qPCR for *W. chondrophila* and *L. monocytogenes* plasmids were within the acceptable limits, implying high reproducibility and repeatability of the assay. The use of the qPCR assay resulted in 53 positive identifications among 211 veterinary samples against only 19 when standard cultural methods were used. On the basis of these results, we determined 100% sensitivity and 100% specificity for our new qPCR. Dual abortigenic agents were identified in 8.6% and 26.6% of vaginal swab samples and placental tissues, respectively. To conclude, this new qPCR will be of great value in the simultaneous and rapid diagnosis of *W. chondrophila* and *L. monocytogenes* in large-scale screening programs and also during outbreaks.

**Mots Clefs:** Real-time PCR; Recombinant plasmids; Absolute quantification; Intracellular bacteria; Co-culture; Biological samples.

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## Lipidomics of bovine ovarian follicle using MALDI-TOF Mass Spectrometry

Bertevello, P.S., Banliat, C., Teixeira-Gomes A.P., Labas V., Uzbekova S.

Physiologie de la reproduction et des comportements INRA, CNRS, PAIB, IFCE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France.

Lipids and fatty acids (FA) have an important role in reproductive processes of many species. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) analysis of lipids in porcine ovarian cells showed significant differences in lipid profiles in follicles, ovarian stroma, follicular cells and follicular fluid (Uzbekova et al, 2015). Lipid content, localisation and modes of action of lipids in bovine ovary, and more precisely in ovarian follicle, remain unknown. The aim of this work was to adapt Intact Cell MALDI-TOF (ICM-MS) technology to compare lipid profiles between somatic follicular cells, follicular fluid and the oocyte within an ovarian follicle in bovine. Ovaries from 12 Holstein cows were collected from slaughterhouse. Follicles were dissected to obtain Theca (TH), Granulosa (GC), and Follicular fluid (FF). Additionally, cumulus-oocyte complexes were separated in oocyte (OO) and cumulus (CC). ICM-MS was performed and lipid spectral profiles (3000 shots spectra) were acquired from each sample cocrystallized with 2,5-dihydroxyacetophenone (DHAP) matrix. Using an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker) in positive reflector mode the peaks were detected in range of 100 to 1000 m/z. The values acquired from the normalized peak heights (NPH) were quantified by Progenesis MALDI (Nonlinear Dynamics). Coefficient of variation (CV%) was calculated for validate data. Multivariate Principal Component Analysis (PCA), ANOVA and Student test were applied to NPH values to compare lipid content variation between follicular compartments. Lipids were extracted from the follicles and analyzed by high-resolution MSMS top-down analysis using LTQ Velos Orbitrap operating in positive mode and annotated for LipidMaps. 462 peaks ranging from m/z 100-1000 were detected in follicular cells, OO, and FF. Oocytes showed the most differential lipid profile, including 304 differential peaks comparing to GC. 226 differential peaks were found between FF and GC. Some of differential peaks, ranged from m/z 717-882, were identified as phosphatidylcholine (PC), sphingomyelins (SM) and triacylglycerol (TG). In CC and OO, a variety of FA and others lipids like Lyso-PC and SM were more abundant (2 to 8 times) compared to other compartments. In conclusion, OO, FF and somatic follicular cells demonstrated distinct structural lipid information.

Mots clefs: lipids, bovine ovarian follicle, MALDI-TOF mass spectrometry

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## Etude métabolomique par RMN de la maladie de Huntington dans un modèle drosophile

Marylène Bertrand, Hervé Meudal, Martine Decoville & Céline Landon

Centre de Biophysique Moléculaire, CBM CNRS UPR4301,  
Rue Charles SADRON, 45071 Orléans cedex 02

Les maladies neurodégénératives, Alzheimer, Parkinson, Huntington..., affectent un nombre croissant de personnes dans les pays industrialisés, en partie en raison de l'allongement de la durée de vie. C'est actuellement un problème de santé publique majeur. L'analyse des conséquences tissulaires de ces maladies s'effectue en général par des examens microscopiques à des stades avancés ou post-mortem. Les conséquences métaboliques de ces maladies aux stades précoces (avant que les neurones ne dégèrent) sont actuellement très mal connues.

Depuis quelques années, la RMN s'est révélée être un outil majeur pour l'analyse métabolomique. En effet, c'est une méthode d'analyse non-invasive et non destructive qui permet d'identifier et de quantifier les métabolites issus d'un échantillon biologique et de suivre leurs variations. La RMN 1D du proton est utilisée en métabolomique pour analyser des mélanges complexes tels que les biofluides (urine, plasma, liquide cérébro-spinal,...) et générer un profil multiparamétrique de l'état physiologique de l'organisme. Comparée à d'autres techniques d'analyses, la RMN permet une préparation d'échantillons simple et rapide, des analyses hautement reproductibles et une quantification facilitée. Associée à des analyses statistiques multivariées, il est alors possible de traiter un nombre très important de données et d'en dégager les aspects les plus intéressants. L'information contenue dans les spectres peut ainsi être structurée, résumée ou prédite par des méthodes descriptives (comme l'analyse en composante principale ou PCA), ou par des méthodes prédictives (comme la PLS). Les graphiques issus de l'analyse de ces données permettent de mettre en évidence des relations difficilement saisies par l'analyse directe des données.

L'étude développée ici vise à identifier des signatures métaboliques à des stades pré-symptomatiques de différentes maladies neurodégénératives modélisées chez *Drosophila melanogaster*. Les résultats qui seront présentés ont été obtenus grâce à un spectromètre RMN 700 MHz avec cryosonde dans un modèle de la maladie de Huntington.

## **Influence de l'expression du FcRn sur le développement tumoral et la réponse au traitement par anticorps thérapeutiques dans un modèle de tumeurs pulmonaires**

Diana Cadena Castaneda<sup>1</sup>, Christine Dhommée<sup>1</sup>, Emilie Dalloneau<sup>3,4</sup>, Christophe Arnoult<sup>1</sup>, Delphine Fouquenot<sup>3,4</sup>, Christelle Parent<sup>3,4</sup>, Laurie Lajoie<sup>1,2</sup>, Thomas Baranek<sup>3,4</sup>, Nathalie Heuzé-Vourc'h<sup>2\*</sup> et Valérie Gouilleux-Gruart<sup>1,3\*</sup>

1 Université François Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France, 2 Université François Rabelais, INSERM UMR1100, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Tours, France, 3 Laboratoire d'immunologie, CHRU de TOURS, Tours, France

\* Ces auteurs ont contribué à part égale à ce projet

Le récepteur néonatal ou FcRn, est la protéine responsable de l'homéostasie de l'albumine, du recyclage et de la transcytose des immunoglobulines G (Roopenian et al. Nat. Rev. Immunol 2007). Récemment, plusieurs articles ont rapporté la contribution du FcRn dans la réponse immunitaire anti-tumorale en montrant que son expression était modulée dans des conditions pathologiques, notamment dans le cancer du poumon (Baker et al. Immunity 2013; Dalloneau et al. Oncotarget 2016). L'origine cellulaire de la dérégulation du FcRn dans les tumeurs et ses conséquences sur la réponse immunitaire anti-tumorale et la pharmacodynamique des anticorps ne sont pas clairement identifiées. L'objectif de la thèse est d'étudier l'influence de l'expression du FcRn dans différents compartiments cellulaires sur la réponse immunitaire et sur le traitement par anticorps thérapeutiques. Pour cela, des souris sauvages (BL6/WT) et des animaux n'exprimant pas le FcRn (BL6/KO) sont inoculés avec des cellules cancéreuses de mélanome (B16F10) par voie intraveineuse conduisant au développement de tumeurs pulmonaires (Overwijk and Restif. Curr Protoc Immunol 2001). Nos résultats montrent que la tumorigénèse est amplifiée chez les souris KO FcRn et qu'elle est associée à une altération du profil de maturation des cellules NK. L'administration d'un anticorps monoclonal de souris (TA99) reconnaissant l'antigène TRP1 exprimé à la surface des cellules cancéreuses permet de limiter significativement le développement tumoral des cellules B16F10 chez les souris sauvage (WT), mais pas chez les animaux FcRn KO. L'ensemble des résultats obtenus dans ce modèle soutient clairement la notion que l'expression du FcRn par les cellules du microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans l'immunité anti-tumorale et la réponse aux traitements par anticorps thérapeutiques.

## Machine learning and data mining in Kinase Drug Discovery

Fabrice Carles<sup>1</sup>, Nicolas Bosc<sup>1</sup>, Christophe Meyer <sup>2</sup>, Pascal Bonnet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR CNRS-Université d'Orléans 7311, Université d'Orléans BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France

<sup>2</sup>Janssen-Cilag, Centre de Recherche Pharma, CS10615 - Chaussée du Vexin, 27106 Val-de-Reuil, France

So far 518 protein kinases (PK) have been identified in the Human genome (1). They share a common mechanism of protein phosphorylation and are involved in many vital biological processes of eukaryotic cells. Impaired kinase phosphorylation function is recognized to play a role in diseases like cancer, diabetes or inflammatory diseases. As a result, considerable effort has been made to find or design potent and selective protein kinase inhibitors (PKIs) as new potential drugs.

Here we present three in-silico tools that can help the discovery of new potent PKIs. They all use statistical methods that will create models from sets of descriptors to predict dependent variable (binding activities). The differences between these three tools come from the molecular entities described and the sought objectives.

### Bibliography:

[1] G. Manning; D. B. Whyte; R. Martinez; T. Hunter; S. Sudarsanam. Science. 298 (2002) 1912–1934.

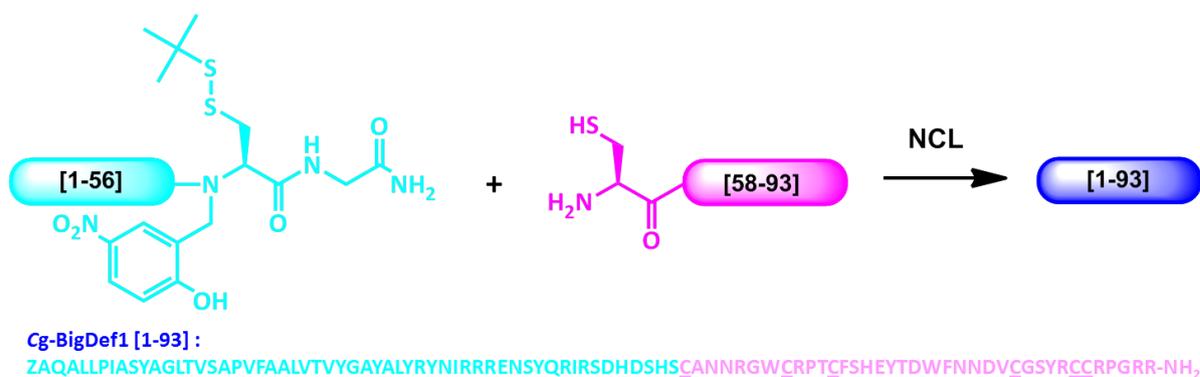
## Native Chemical ligation simplifies the access of multidomain antimicrobial peptides: application to the study of big-defensins.

A.F. Delmas<sup>1</sup>, V.P. Terrier<sup>1</sup>, R.D. Rosa<sup>2,3</sup>, A. Bressan<sup>2</sup>, P. Marceau<sup>1</sup>, A. Vergnes<sup>2</sup>, P. Bulet<sup>4</sup>, E. Bachère<sup>2</sup>, V. Aucagne<sup>1</sup>, D. Destoumieux-Garzón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CBM, CNRS UPR4301, Orléans, Fr; <sup>2</sup>IHPE, CNRS UMR5244, Univ Montpellier, Ifremer, UPVD, Montpellier, France; <sup>3</sup>Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Federal Univ Santa Catarina, Brazil; <sup>4</sup>Institut A. Bonniot, CNRS UMR5309, Grenoble, Fr

Antimicrobial peptides are produced by virtually all living organisms. In multicellular organisms, they are major effectors of the innate immune system. Among them, defensins are small cationic disulfide-rich proteins (~40 amino acids), which can form pore-like membrane defects on targeted bacteria or inhibit key bacterial metabolic pathways.<sup>1</sup> In *Crassostrea gigas* oysters, BigDefensin 1 (Cg-BigDef1, 93 aa), expressed in hemocytes, is strongly induced in response to bacterial challenge.<sup>2</sup> It is composed of two domains, one highly hydrophobic N-terminal region and one defensin-like C-terminal region.

To decipher the mechanism of Cg-BigDef1 antimicrobial activity, which is perfectly stable at high salinity, we completed the total synthesis of this protein by native chemical ligation in very good yield. Notably, the synthesis of the thioester partner was efficiently performed using our recent methodology based on an *N*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)-cysteine (*N*-Hnb-Cys) thioesterification device.<sup>3</sup>



We show here that Cg-BigDef1 permeabilizes bacteria at micromolar concentrations and that its N- and C-terminal domains display synergistic activities.

### References

- (1) Schmitt, P.; Wilmes, M.; Pugnière, M.; Bachère, E.; Sahl, H.; Schneider, T.; Destoumieux-Garzon, D. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 29208.
- (2) Rosa, R. D.; Santini, A.; Fievet, J.; Bulet, P.; Destoumieux-Garzón, D.; Bachère, E. *PloS One* **2011**, *6*(9), e25594.
- (3) Terrier, V.P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 33

## Green ultrasound-assisted extraction of natural products from *Silybum marianum* seed with potent cosmetic applications

Samantha Drouet<sup>ab</sup>, Jean Raymond Vanier<sup>c</sup>, Éric Lainé<sup>ab</sup>, Christophe Hano<sup>ab\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures INRA USC13, Pôle Universitaire d'Eure et Loir, Chartres, France ; <sup>b</sup> GDR3711 Cosmatif, Université d'Orléans rue de Chartres BP6759, 45067 Orléans Cedex2 ; <sup>c</sup> PMA28 SAS, 1 place de l'Eglise, 28140 VARIZE, France ; \* Christophe Hano, +33 2 37 30 97 53, hano@univ-orleans.fr

*Silybum marianum* (milk thistle) accumulates in its seed high amount of flavonolignans (isosilybins, silybins, silychristin, silydianin; aka silymarin) resulting from the coupling of a flavonoid part with coniferyl alcohol, the lignan precursor in plants. This plant constitute the almost unique source of flavonolignans deriving from taxifolin and is thus considered as the model plant for the study of their biosynthesis. Silybins display a wide range of biological activities still under-exploited for cosmetic applications, such as antioxidant, skin anti-inflammatory and UV-B protection which can result in an effective skin protection against sunburn or cancers making it necessary to develop efficient extraction protocols.

The present study deals with ultrasound-assisted extraction (UAE) of *Silybum marianum* flavonolignans and their quantification using a reverse-phase HPLC system with UV detection. Scanning Electron Microscopy imaging showed the alteration of the seedcoat by the US treatment which explains the high yield of flavonolignans from the milk thistle seed coat using this green technology. The optimal conditions for UAE were: EtOH 50% as solvent, an extraction time of 60 min at 25°C and an ultrasound frequency of 45 kHz. These optimized and validated conditions allowed high yields of silymarin, isosilybins, silybins, silychristin and silydianin in comparison to published methods. A high antioxidant capacity of the extracts was revealed both by CUPRAC and FRAP assays. These assays are used to discriminate antioxidants by their physicochemical nature. The FRAP method is used to evaluate the antioxidant activity of hydrophilic substances whereas CUPRAC is applied to both lipophilic and hydrophilic antioxidants. Our results indicated that flavonolignans are the main antioxidant contributors in the CUPRAC assay, whereas FRAP assay reveal the presence in our extracts of more hydrophilic and antioxidant compounds yet to identify.

The procedure presented here allows an efficient extraction and quantification of the main flavonolignans with potent antioxidant activities for cosmetic applications from seeds of *Silybum marianum* by green chemistry (reduced energy consumption and use of green solvent). Deeper phytochemical characterization of the extracts is under progress.

## Apoptotic activity of aqueous extract of *Dunaliella salina* cultivated under stressed conditions

Fatma Elleuch<sup>1,2</sup>, Patrick Baril<sup>2</sup>, Slim Abdelkafi<sup>1</sup>, Chantal Pichon<sup>2</sup>, Imen Fendri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biological Engineering Department, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia

<sup>2</sup> Center for Molecular Biophysics (CBM), CNRS UPR4301, Orleans, France

*Dunaliella salina* (*D. salina*) is a unicellular green microalga tolerating various stressful conditions by producing high value of metabolites like carotenoids. These compounds are famous by their antioxidant and anticancer activities. To improve the antiproliferative properties of *D. salina*, a response surface methodology was used to maximise carotenoids production with studying the effects and the interactions established between salinity, light intensity and nitrogen availability. The optimal conditions were found at 2 M of salinity, light intensity level of 540  $\mu\text{molphoton}/\text{m}^2.\text{s}$  and nitrogen concentration of 1 mM with a carotenoids amount produced of  $25.46 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

The triple-negative breast cancers are a highly aggressive breast cancer as they cannot be treated with the conventional endocrine therapy or targeted therapies because they are characterised by the absence of estrogen (ER), progesterone (PR), and HER2 receptors. 4T1 murine breast cancer cells were used to study the effect of different methods of extraction from stressed and non-stressed *D. salina*. The obtained results show that the aqueous extract of stressed *D. salina* is the most toxic. We have also assessed the effect on human lung carcinoma A549 cells and human cervical carcinoma HeLa cells. The cytotoxicity level was dependent on cell types; HeLa cells being more sensible than A549 cells. Interestingly, extracts from *D. salina* when grown under stress conditions were 3-fold more efficient than those obtained under normal conditions.

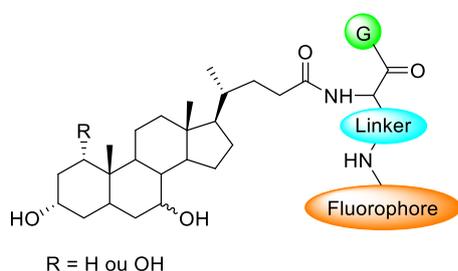
## Conception et synthèse de nouvelles sondes pour l'imagerie cellulaire de la cholestase

Marion Gay<sup>1</sup>, Karen Ple<sup>1</sup>, Simone Khalil<sup>2</sup>, Remy Le Guevel<sup>4</sup>, Françoise Brée<sup>3</sup>, Christiane Guguen-Guillouzo<sup>2,4</sup>, Sylvain Routier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ICOA-CNRS UMR 7311- Université d'Orléans, Pôle de Chimie- 45100 Orléans, <sup>2</sup> Biopredic International – Parc d'Affaires de la Breteche- Bat A4 - 35760- Saint Grégoire, <sup>3</sup> Eurosafe - Parc d'Affaires de la Breteche- Bat B1 - 35760- Saint Grégoire  
<sup>4</sup> ImPACcell Platform- Biosit – Faculté de médecine, Université Rennes 1 – Rennes

Le foie joue un rôle essentiel dans l'assimilation, la métabolisation et l'excrétion de composés endogènes et exogènes. A travers la pharmacopée il existe de nombreux médicaments utilisés couramment induisant des lésions cholestatiques au niveau hépatique. La cholestase intrahépatique, l'une des formes les plus sévères, conduit chez l'homme à des troubles de l'excrétion de bile et à l'accumulation d'acides biliaires, de bilirubine et de cholestérol, conduisant à un ictère (jaunisse). Il n'existe actuellement aucun test de screening prédictif de l'effet cholestatique de candidats médicaments. Disposer d'un tel test permettrait de déterminer le potentiel cholestatique d'un composé actif bien avant sa commercialisation. Le but de ce travail porte sur la synthèse de sondes fluorescentes, dérivées des acides biliaires, utilisables comme biomarqueurs pour le développement d'un test de screening.

Afin de développer ces sondes, différents fluorophores ont été sélectionnés et greffés *via* un linker sur l'acide cholique et ses dérivés. La ligné cellulaire HepaRG<sup>TM</sup> a été identifiée par Biopredic Int. comme modèle de génération de la cholestase, mimant les évènements cholestatiques. Ces cellules ont été traitées avec trois molécules connues pour induire une cholestase : la Chlorpromazine (CPZ), le Fasudil (FSD) et le Bosentan (BSN). Après induction de la cholestase, la sonde ursodesoxycholique s'est bien fixée sur les canalicules altérés, permettant de suivre l'accumulation des acides biliaires.



Il est donc fort probable que ces sondes soient de bons biomarqueurs potentiels pour le développement d'un futur test de screening de génération de cholestase pour des candidats médicaments. Des applications pharmaceutiques et cosmétiques sont d'ores et déjà envisagées.

## Unveiling the participation of avian kinin ornithokinin (OK) and its receptors in the chicken inflammatory response

Damien Garrido, Nathalie K. Chanteloup, Mélanie Pinaud, Angéline Trotereau, Catherine Schouler and Rodrigo Guabiraba

ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, 37380, Nouzilly, France

Vasoactive peptides are key early mediators of inflammation released through activation of different enzymatic systems. Among them, the mammalian kinin-kallikrein (K-KLK) system makes bradykinin (BK) through proteolytic cleavage of a kininogen precursor by enzymes named kallikreins. The vasoactive peptide BK then acts through specific ubiquitinary receptors (B1 and B2) to promote vascular inflammation and tissue injury. In chickens, the BK-like peptide ornithokinin (OK) was already characterized and one of its receptors (B2) was cloned. Also, it has been shown that OK, but not BK, is vasodilatory in chickens when systemically administered. However, no study has evaluated so far the participation of chicken K-KLK system components in the inflammatory response. In mammals, macrophages can release various inflammatory mediators after BK stimulation. Using chicken macrophages (HD11 cell line and bone marrow-derived macrophages - BMDM), we showed that chicken B1- and B2-like receptors are expressed and upregulated by *E. coli* LPS or by an avian pathogenic *E. coli* (APEC) strain. Also, OK induced intracellular calcium increase and potentialized zymosan-induced ROS production and dextran-FITC endocytosis. OK did not promote APEC killing and had no pro-inflammatory effect alone. However, when combined with LPS or APEC, OK upregulated cytokine/chemokine gene expression and NO production in chicken macrophages. This effect was not blocked by canonical non-peptide B1/B2 receptor antagonists but was  $G_{(i/o)}$ -coupled GPCR- and PI3K/AKT-dependent. Importantly, chicken macrophages did not respond to BK in any evaluated parameter. *In vivo*, APEC infection led to upregulation of OK receptors expression in chicken lungs and liver. Also, APEC infection led to significant upregulation of OK precursor kininogen 1 (*KNG1*) expression in liver and in cultured hepatocytes (LMH). We thus provide hitherto unknown information on how OK and its receptors can modulate (or are modulated) during inflammation and infection in chickens, thus highlighting the interest in studying the K-KLK system and other neglected early mediators of inflammation in birds.

## **Apport innovant de la poly-L-Lysine comme agent anti-biofilm dans les sondes d'intubation endotrachéales contaminées par *Pseudomonas aeruginosa* pour prévenir les pneumopathies nosocomiales\***

V. Hervé<sup>1</sup>, A. Guillon<sup>1,2</sup>, D. Fouquenot<sup>1</sup>, C. Henry<sup>1</sup>, E. Morello<sup>1</sup>, S. Georgeault<sup>3</sup>, C. Barc<sup>4</sup>, F. Gauthier<sup>1</sup> et M. Si-Tahar<sup>1</sup>.

1 Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR) – INSERM U1100, Faculté de Médecine F. Rabelais, Tours; 2 CHU Tours, Service de Réanimation polyvalente, Tours ; 3CHU de Tours, Laboratoire de Microscopie électronique, Tours ; 4INRA, UE1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, PFIE, Nouzilly.  
virginie.herve@univ-tours.fr

**Introduction:** La ventilation mécanique invasive d'un patient est réalisée à l'aide d'une sonde endotrachéale. Or, un biofilm polymicrobien se forme progressivement sur cette sonde et accroît le risque de propagation aux voies aériennes inférieures. Ce biofilm confère aux bactéries une résistance accrue aux antibiotiques et les pratiques médicales actuelles ne permettent pas d'éliminer ce biofilm. La principale bactérie de ce biofilm est *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. Sur la base de nos travaux (AJRCCM, 2013), nous avons évalué l'apport de la poly-L-lysine (pLK) dans l'élimination des biofilms de *P. aeruginosa* présents dans les sondes endotrachéales.

**Méthodes:** L'effet anti-biofilm de la pLK a été évalué dans un premier temps, sur des biofilms produits *in vitro* avec différentes souches de *P. aeruginosa* (plaque 96 puits, sondes endotrachéales), puis dans un second temps, *ex vivo* sur les biofilms des sondes prélevées chez des patients infectés par *P. aeruginosa*. Des dénombrements bactériens ont été réalisés afin de quantifier le potentiel anti-biofilm de la pLK et les résultats confirmés par des analyses de bioluminescence et de microscopie électronique à balayage.

**Résultats:** Une seule administration de pLK à 10  $\mu$ M, avec 2 minutes de contact a permis une élimination de plus de 90 % des bactéries composant les biofilms formés *in vitro* ou *ex vivo*.

**Conclusion:** La pLK apparaît donc comme une molécule anti-biofilm innovante qui pourrait être appliquée dans les sondes de patients sous ventilation mécanique pour limiter le risque d'infections respiratoires dues à *P. aeruginosa*.

\* Brevet européen N°15306598.2 "Methods for inhibiting or reducing bacterial biofilms" déposé le 09/10/2015 – (Virginie Hervé, Antoine Guillon et Mustapha Si-Tahar).

## Effects of a biochar amendment to improve the physico-chemical characteristics of a former mine extraction soil contaminated mainly by Pb and As and to enhance the growth of three willow species

Manhattan Lebrun<sup>a\*</sup>, Carmelo Macri<sup>a</sup>, Nour Hattab-Hambli<sup>a</sup>, Florie Miard<sup>a</sup>, Mikael Motelica-Heino<sup>b</sup>, Sylvain Bourgerie<sup>a</sup> and Domenico Morabito<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> University of Orleans, INRA USC1328, LBLGC EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France, <sup>b</sup> ISTO, UMR 7327 and CNRS/University of Orléans, Campus Géosciences, 1A, Rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cedex 2, France, \* E-mail: manhattan.lebrun@etu.univ-orleans.fr

Mining activities led to a wide and high environmental pollution of terrestrial ecosystems due to the presence of metal(loid)s in tailings. Those contaminated areas present a risk for health and hence need to be rehabilitated. *Ex situ* methods for soil remediation have been used for a long time but are expensive and disruptive to soil. In contrast phytoremediation techniques for stabilization or extraction of metal(loid)s could be an efficient alternative as they provide a low cost and environmentally friendly option. However, due to the often poor nutrient content of these contaminated soils, amendments must be added to enhance plant growth and to ameliorate phytoremediation efficiency. Biochar, a pyrogenic product, is a promising amendment for assisted phytoremediation. The aims of our study were (i) to evaluate the effect of a pinewood biochar on the physicochemical properties of a former mine contaminated technosol, (ii) to assess the mobility and phytoavailability of As and Pb and (iii) to investigate the remediation potential of three willow species (*Salix alba*, *Salix viminalis* and *Salix purpurea*). A greenhouse experiment was conducted with contaminated technosols amended with biochar and garden soil, single or combined, revegetated with the 3 willow species. Physicochemical properties of soil pore water (SPW) as well as metal(loid)s concentrations were determined. Plant growth, *Salix* organ's dry weight and metal(loid)s uptake were determined in order to evaluate the phytoremediation potential of the three *Salix* species studied. Biochar increased pH and electrical conductivity of SPW. Biochar addition had no effect on As mobility but decreased SPW Pb concentration by 70%. For the three *Salix* species investigated, biochar addition to the polluted soil induced a better growth and a higher dry weight production. In most modalities tested, the metal(loid)s content in the *Salix* organs increased due to the biochar application. Globally, a positive effect of biochar was noticed on the soil qualities (pH and electrical conductivity increase) and plant growth. Metal(loid)s were mostly restrained to the roots. Among species tested, *Salix alba* presented the least metal(loid)s concentrations in the aerial parts, which made it particularly a suitable tool for Pb soil phytostabilization.

## La Résonance Magnétique Nucléaire pour la chimie et pour la biologie

Hervé Meudal, Marylène Bertrand, Laurence Jouvensal, Agnès Delmas, Françoise Paquet, Karine Loth & Céline Landon

Groupe thématique « RMN des Biomolécules », Centre de Biophysique Moléculaire, CBM CNRS UPR4301, Rue Charles SADRON, 45071 Orléans cedex 02

Dans le cadre de la fédération de Recherche Physique et Chimie du Vivant (FR2708), 3 spectromètres RMN haute résolution ont été acquis ou rénovés en 2013 au Centre de Biophysique Moléculaire : un spectromètre BRUKER 700MHz équipé d'une cryosonde majoritairement dédié aux études de biologie structurale et de métabolomique, un spectromètre BRUKER 600MHz majoritairement dédié aux applications pour la chimie et équipé d'un passeur d'échantillons 24 positions, un spectromètre BRUKER 400MHz majoritairement dédié aux études des agents de contraste.

Une activité de service est proposée sur le spectromètre à 600MHz aux chercheurs de la fédération de recherche – avec un accès autonome au spectromètre pour les utilisateurs formés - et aux établissements publics ou privés extérieurs. Dans tous les cas – service interne ou externe- un ingénieur d'études est disponible pour conseiller, optimiser et réaliser les expériences.

Ce spectromètre permet de fournir un service dans une large variété d'applications de la R.M.N. chimique et biologique telles que les spectres 1D, 2D proton (COSY, TOCSY, NOESY ...), les spectres 1D hétéronucléaires <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P et les spectres 2D hétéronucléaires <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N (HSQC, HMBC ...). Les demandes des utilisateurs, chimistes ou biologistes, concernent principalement la vérification de la qualité/pureté de leur produit, de sa stabilité ou de son repliement, le suivi des synthèses organiques, ou l'analyse d'une grande variété de bio-molécules.

Le spectromètre BRUKER 700MHz est ouvert sous forme de projets collaboratifs. La cryosonde assure une grande sensibilité aussi bien pour les études de biologie structurale que pour la détection de métabolites en très faible concentration. Les activités de recherches de biologie structurale portent majoritairement sur l'étude des structures 3D, la dynamique et les interactions entre biomolécules (protéines, acides nucléiques, complexes moléculaires, ...). Les collaborations actuelles dans le domaine de la métabolomique concernent principalement la santé humaine ou animale, et les principaux échantillons étudiés par RMN sont des fluides biologiques (urines, plasmas, salives, ...). En effet, la RMN permet de suivre la variation de différents métabolites sous l'influence de stimuli environnementaux et/ou de l'état physiologique du système étudié.

## Confocal Raman spectroscopy for transepidermal tracking of nano-encapsulated cosmetics bioactive compounds

L. Miloudi<sup>1</sup>, F. Bonnier<sup>1</sup>, H.T.P. Nguyen<sup>1</sup>, A. Tfayli<sup>2</sup>, F. Yvergnaux<sup>3</sup>, I. Chourpa<sup>1</sup>, E. Munnier<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes – Université de Tours, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France

<sup>2</sup> Laboratory of lipids: Analytical and Biological Systems Lip(Sys)<sup>2</sup>, Université Paris-Saclay, France

<sup>3</sup> Bioeurope Solabia Group, Anet, France

\*e-mail: emilie.munnier@univ-tours.fr

Confocal Raman microscopy is a strongly emerging analytical technique in the field of skin research<sup>1</sup>. Although it has been widely evaluated for *in vivo* diagnosis of different skin lesions, numerous attractive pharmaceuticals and cosmetics applications have also been pointed out. Notably, the delivery efficacy of bioactive compounds is directly linked to their penetration through the different skin layers in order to reach specific molecular targets. Current strategies predominantly encourage the use of natural products for topical formulations due to their high efficiency with minimal toxicity. However, the majority of relevant biomolecules identified by the cosmetic industry exhibit poor solubility in water leading to the development of new strategies for the preparation of optimized cosmetic products. For instance, using vehicles to encapsulate the bioactive has been investigated to bypass the barrier function of the skin and achieve better uptake in the deepest layers<sup>2</sup>. Natural polysaccharides such as alginates are very attractive for the conception of nanocarriers with the required physico-chemical properties for diffusion through the stratum corneum. Although major advancements have been made in the area of cosmetic products formulation, biological assessments remain particularly limited due to a lack of suitable analytical techniques. The noninvasiveness of the Raman technique combined to the nondestructive attribute of the measurements are great advantages for the monitoring of the physiological response of the skin after exposure to different exogenous molecules. In accordance with the expectations of the different industrial partners involved in the research program, the challenge addressed is the development of an *in vitro* model for the screening of new formulations. In addition to optimizing an experimental set up for the tracking of the nano-encapsulated bioactive by means of z profiling, a strong emphasis has been placed on the monitoring of the lipids matrix of the stratum corneum following topical application<sup>3</sup>. Numerous ingredients are involved in the process of nano-encapsulation with little information available on possible effect at the molecular level. Ultimately, Raman spectroscopy will be used to guide and optimize formulation strategies in cosmetics production in order to ensure an enhanced efficiency without leading to a disruption of the skin barrier function and integrity.

**References :** (1) F. Bonnier, A. Mehmood, P. Knief, A. Meade, W. Hornebeck, H. Lambkin, K. Flynn, V. McDonagh, C. Healy, T. Lee, *Journal of Raman spectroscopy*, 2011, 42, 888-896. (2) H.T.P.Nguyen, E. Munnier, M. Soucé, X. Perse, S. David, F. Bonnier, F. Vial, F. Yvergnaux, T. Perrier, S. Cohen-Jonathan, *Nanotechnology*, 2015, 26, 255101. (3) S. Ali, F. Bonnier, K. Ptasiński, H. Lambkin, K. Flynn, F. Lyng, H. Byrne, *Analyst*, 2013, 138, 3946-3956.

### Acknowledgements

This work is part of the COSMICC project (ARD-2020 Cosmetosciences research program), and we want to thank our industrial partner Bioeurope as well as Région Centre Val de Loire for financial support.

*Actes du 29<sup>ème</sup> Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 13-14 Octobre 2016*

## **Imagerie de bioluminescence pour les champignons filamenteux colonisant les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose: Application à l'espèce *Scedosporium apiospermum***

Anaïs Hérivaux<sup>1</sup>, Amandine Gastebois<sup>1</sup>, Patrick Vandeputte<sup>1</sup>, Charlotte Godon<sup>1</sup>, Bénédicte Lelièvre<sup>1,2</sup>, Maxime Fleury<sup>1</sup>, Jean-Philippe Bouchara<sup>1,3</sup>, Jean-Paul Latgé<sup>4</sup>, Nicolas Papon<sup>1</sup>

1 Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Angers, France. 2 Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France. 3 Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France. 4 Unité des Aspergillus, Institut Pasteur, Paris, France.

Le complexe d'espèces *Scedosporium apiospermum* se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux colonisant les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose. La thermotolérance de ces champignons, leur aptitude à disséminer par voie sanguine et leur faible sensibilité aux antifongiques actuels en font de redoutables pathogènes en cas d'immunodépression, notamment après transplantation pulmonaire chez un patient colonisé [1]. Aucun système de suivi *in vivo* chez l'animal n'étant disponible pour évaluer la virulence des souches de *S. apiospermum*, nous développons actuellement l'imagerie de bioluminescence pour cette espèce. Cette approche repose sur le transfert chez le pathogène d'un gène codant une luciférase permettant de visualiser sa prolifération dans l'organisme animal en temps réel [2]. Dans le cadre de ce projet, nous envisageons ainsi : (i) de construire un vecteur d'expression adapté à l'espèce *S. apiospermum*; (ii) d'optimiser la séquence du gène luciférase pour garantir un fort taux d'expression dans les cellules de *S. apiospermum*; (iii) de transformer la souche de référence IHEM 14462 de *S. apiospermum* avec le vecteur d'expression adapté contenant une version optimisée de la luciférase et de sélectionner un clone exprimant de manière constitutive la luciférase; puis (iv) de valider la souche bioluminescente dans un modèle expérimental que nous avons récemment développé dans l'équipe; et (v) d'appliquer cet outil à l'étude de gènes potentiellement impliqués dans la virulence, les histidine kinases hybrides [3]. A terme, cette technologie permettra ainsi une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques et l'identification de nouvelles cibles chez *S. apiospermum*. Elle facilitera également l'évaluation de nouveaux protocoles thérapeutiques, et contribuera ainsi à l'amélioration de la prise en charge des patients.

[1] Cimon B., Pihet M., Bouchara J.P. (2015) Infections dues aux champignons du genre *Scedosporium* et apparentés. EMC - Biologie médicale. 11: 1-12.

[2] Papon N., Courdavault V., Lanoue A., Clastre M., Brock M. (2014) Illuminating fungal infections with bioluminescence. PLoS Pathogens. 10: e1004179.

[3] Hérivaux A., So Y.S., Gastebois A., Latgé J.P., Bouchara J.P., Bahn Y.S., Papon N. (2016) Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: the Hybrid Histidine Kinase Family. PLoS Pathogens. 12: e1005683.

## New Inhibitors Targeting Stat5 in Leukemia Cells

Ludovic Juen<sup>a</sup>, Marie Brachet-Botineau<sup>b,c</sup>, Jérôme Bourgeois<sup>b,c</sup>, Gildas Prié<sup>a</sup>, Olivier Héroult<sup>b,c</sup>  
 Fabrice Gouilleux<sup>b</sup>, Marie-Claude Viaud-Massuard<sup>a</sup>

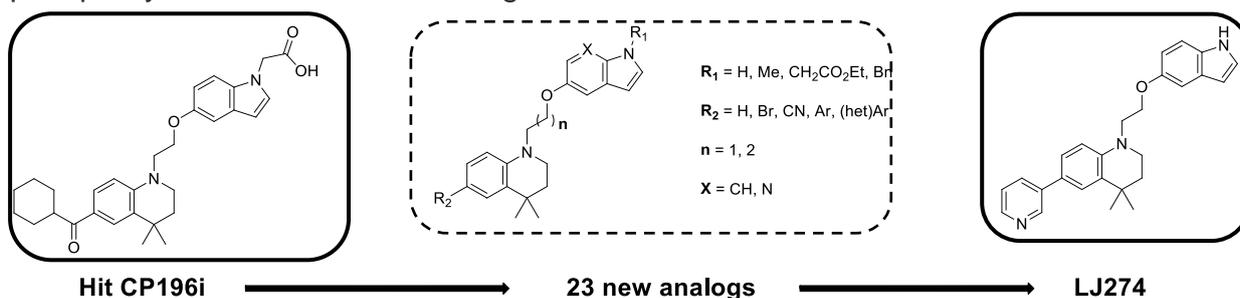
<sup>a</sup> Equipe IMT "Innovation Moléculaire et Thérapeutique" - GICC UMR 7292 CNRS - Université de Tours - Labex SYNORG - Faculté de Pharmacie - 31 avenue Monge - 37200 Tours - France.

<sup>b</sup> Equipe LNOx "Niche leucémique & métabolisme oxydatif" - GICC UMR 7292 CNRS - Université de Tours - Faculté de Médecine - Bâtiment Dutrochet - 10<sup>bis</sup> boulevard Tonnellé - 37032 Tours - France.

<sup>c</sup> CHRU de Tours - Service d'Hématologie Biologique - 2 boulevard Tonnellé - 37044 Tours - France  
 - [gildas.prie@univ-tours.fr](mailto:gildas.prie@univ-tours.fr)

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a myeloproliferative disease of the hematopoietic stem cell (HSC) due to t(9;22) genomic translocation-derived BCR-ABL fusion gene. BCR-ABL codes for a tyrosine kinase that activates multiple signaling pathways in CML cells including the transcription factors Stat5a and Stat5b (Signal Transducers and Activators of Transcription 5a/5b). Imatinib, an inhibitor of Bcr-Abl, is currently used as first-line treatment of CML. However most of the patients relapse after treatment interruption and about 15% experienced failed therapy.

Several experimental facts underlined the essential role of Stat5 proteins in the maintenance of CML. Inhibition of Stat5 would contribute besides to tackle the survival and self-renewing of leukemic stem cells, and also to reduce the resistance of CML cells to Bcr-Abl kinase inhibitors. In a first set of experiments, we tested a series of molecules from our chemical library to analyze their effects on CML cell proliferation and Stat5 activity. One molecule (CP-196i) was identified as able to inhibit Stat5 phosphorylation and leukemic cell growth.



Hit CP196i, new analogs and the lead LJ274

Starting from this hit compound, 23 new analogs have been synthesized and evaluated by proliferation and viability studies carried out on CML cell lines KU812 and K562. Among them, LJ274 slowed proliferation and decreased viability of CML cell lines, with  $EC_{50} = 6 \mu\text{M}$  on KU812 cells and  $9 \mu\text{M}$  on K562 cells. Stat5 phosphorylation assays clearly showed that LJ274 inhibited Stat5 activation and expression. Apoptosis assays and evaluation of synergistic effects with Imatinib will be presented.

Les conférences sont classées par ordre de présentation au colloque et les posters sont classés par ordre alphabétique dans chaque filière de l'école doctorale ou hors école doctorale. Les numéros indiqués correspondent au numéro de page du résumé de la conférence ou du poster.

### **Conférences**

<i>Mesnil M.</i>	<i>page 6</i>	<i>Bras A.</i>	<i>page 75</i>	<i>Oseikria M.</i>	<i>page 79</i>
<i>Duittoz A.</i>	<i>page 7</i>	<i>Cadena Castaneda D.</i>	<i>page 83</i>	<i>Papon N.</i>	<i>page 94</i>
<i>Heuze-Vourc'h N.</i>	<i>page 8</i>	<i>Carles F.</i>	<i>page 84</i>	<i>Prié G.</i>	<i>page 95</i>
<i>Gradek F.</i>	<i>page 9</i>	<i>Cartereau A.</i>	<i>page 74</i>	<i>Raes F.</i>	<i>page 76</i>
<i>Magnen M.</i>	<i>page 10</i>	<i>Casas A.</i>	<i>page 56</i>	<i>Vetel S.</i>	<i>page 49</i>
<i>Ung D.</i>	<i>page 11</i>	<i>Casas G.</i>	<i>page 57</i>		
<i>Sage E.</i>	<i>page 12</i>	<i>Champiré A.</i>	<i>page 66</i>		
<i>Dugé de Bernonville T.</i>	<i>page 13</i>	<i>Chevrier F.</i>	<i>page 67</i>		
<i>Hano C.</i>	<i>page 14</i>	<i>Da Silva M.</i>	<i>page 40</i>		
<i>Bonnafous D.</i>	<i>page 15</i>	<i>David SA.</i>	<i>page 41</i>		
<i>Guinoiseau T.</i>	<i>page 16</i>	<i>Defosse T.</i>	<i>page 42</i>		
<i>Lamendour L.</i>	<i>page 17</i>	<i>Delmas A.</i>	<i>page 85</i>		
<i>Moulin P.</i>	<i>page 18</i>	<i>Drouet S.</i>	<i>page 86</i>		
<i>Papot S.</i>	<i>page 19</i>	<i>El Haddad S.</i>	<i>page 58</i>		
<i>Daniellou R.</i>	<i>page 20</i>	<i>El Hamrani D.</i>	<i>page 59</i>		
<i>Gerard N.</i>	<i>page 21</i>	<i>Elleuch F.</i>	<i>page 87</i>		
<i>Munos A.</i>	<i>page 22</i>	<i>Feat J.</i>	<i>page 71</i>		
<i>Hassanally S.</i>	<i>page 23</i>	<i>Ferté M.</i>	<i>page 53</i>		
<i>Jouravel G.</i>	<i>page 24</i>	<i>Figiel S.</i>	<i>page 43</i>		
<i>Markulin L.</i>	<i>page 25</i>	<i>Fourbon Y.</i>	<i>page 44</i>		
<i>Burger L.</i>	<i>page 26</i>	<i>Gally JM.</i>	<i>page 68</i>		
<i>Rieux C.</i>	<i>page 27</i>	<i>Garrido D.</i>	<i>page 54</i>		
<i>Sappei C.</i>	<i>page 28</i>	<i>Gay M.</i>	<i>page 88</i>		
<i>Lanotte P.</i>	<i>page 29</i>	<i>Guabiraba R.</i>	<i>page 89</i>		
<i>Abergel C.</i>	<i>page 30</i>	<i>Guiguet A.</i>	<i>page 77</i>		
<b><u>Posters</u></b>		<i>Habert L.</i>	<i>page 69</i>		
<i>Al Hajj S.</i>	<i>page 50</i>	<i>Hervé V.</i>	<i>page 90</i>		
<i>Ati J.</i>	<i>page 62</i>	<i>Jestin G.</i>	<i>page 70</i>		
<i>Ayari MG.</i>	<i>page 63</i>	<i>Juen L.</i>	<i>page 45</i>		
<i>Barkallah M.</i>	<i>page 80</i>	<i>Lafontaine F.</i>	<i>page 46</i>		
<i>Beretta M.</i>	<i>page 51</i>	<i>Lebrun M.</i>	<i>page 91</i>		
<i>Bertevello PS.</i>	<i>page 81</i>	<i>Lefort C.</i>	<i>page 55</i>		
<i>Bertrand M.</i>	<i>page 82</i>	<i>Liesecke F.</i>	<i>page 47</i>		
<i>Bertho S.</i>	<i>page 64</i>	<i>Maurel C.</i>	<i>page 48</i>		
<i>Bigot D.</i>	<i>page 52</i>	<i>Mellouk N.</i>	<i>page 78</i>		
<i>Billet K.</i>	<i>page 38</i>	<i>Meudal H.</i>	<i>page 92</i>		
<i>Bitar T.</i>	<i>page 39</i>	<i>Michaudel C.</i>	<i>page 72</i>		
<i>Bouyer L.</i>	<i>page 73</i>	<i>Miloudi L.</i>	<i>page 93</i>		
<i>Braka A.</i>	<i>page 65</i>	<i>Moreau K.</i>	<i>page 60</i>		
		<i>Nadiras C.</i>	<i>page 61</i>		

## JEUDI 13 Octobre 2016

**8h30**

**8h50 - 9h20**

**Accueil des participants**

**OUVERTURE DU COLLOQUE**

**Hélène BENEDETTI**, Présidente de Biotechnocentre

**Emmanuel LESIGNE**, Vice-Président de la Commission Recherche, chargé de la recherche et de la valorisation de l'Université François Rabelais de Tours

**Anne BESNIER**, Vice-Présidente déléguée à l'enseignement supérieur et à la recherche du Conseil Régional Centre-Val de Loire

**SESSION 1** Modérateur : *Bertrand Castaing*

**9h20 - 10h00**

**Marc MESNIL** STIM, CNRS-Université de Poitiers)

**10h00 - 10h30**

**Anne DUITTOZ** (PRC, UMR CNRS 7247-UMR INRA 0085-Université de Tours)

**10h30 - 10h50**

**Nathalie HEUZE-VOURC'H** (CEPR, UMR U1100, Inserm-Université de Tours)

**10h50 - 11h10**

**PAUSE CAFE**

**SESSION 2** Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549 - Modérateurs : *Thierry Moreau et Sophie Tisserau*

**11h10 - 11h25**

**Frédéric GRADEK** (NCC, UMR U1069 Inserm-Université de Tours)

**11h25 - 11h40**

**Mélia MAGNEN** (CEPR, UMR U1100, Inserm-Université de Tours)

**11h40 - 11h55**

**Dévina UNG** (IC, UMR U930 Inserm-Université de Tours)

**11h55 - 14h00**

**Photo du groupe et REPAS**

**SESSION 3** Modérateur : *Nathalie Guivarc'h*

**14h00 - 14h40**

**Evelyne SAGE** Institut Curie, Paris XI, Orsay

**14h40 - 15h00**

**Christophe HANO** (LBLGC, EA1207, Université d'Orléans)

**15h00 - 15h20**

**David BONNAFOUS** (McSAF, Tours)

**15h20 - 15h50**

**ASSEMBLEE GENERALE**

**15h50 - 16h20**

**PAUSE CAFE**

**SESSION 4** Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549 - Modérateurs : *Alain Goudeau et Isabelle Vilogeux-Payant*

**16h20 - 16h35**

**Thibault GUINOISEAU** (MAVIVH, CHRU, UMR U966, Inserm-Université de Tours)

**16h35 - 16h50**

**Lucille LAMENDOUR** (CDIG, EA4245, Université de Tours)

**16h50 - 17h05**

**Pauline MOULIN** Infectiologie et Santé Publique (ISP, UMR 1282 INRA-Université de Tours)

**17h05 - 19h00**

**Session POSTER**

## VENDREDI 14 Octobre 2016

**SESSION 5** Modérateur : *Henri Salmon*

**9h00 - 9h40**

**Sébastien PAPOT** (IC2MP, SMP, UMR 7285 CNRS-Université de Poitiers)

**9h40 - 10h10**

**Richard DANIELLOU** (ICOA, UMR 7311 CNRS-Université d'Orléans)

**10h10 - 10h30**

**Nadine GERARD** (PRC, UMR CNRS 7247-UMR INRA 0085-Université de Tours)

**10h30 - 10h50**

**Audrey MUNOS** (Groupe IMT, Tours)

**10h50 - 11h20**

**PAUSE CAFE**

**SESSION 6** Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549 - Modérateurs : *Luigi Agrofoglio et Agnès Delmas*

**11h20 - 11h35**

**Shalina HASSANALY** (CBM, UPR4301 CNRS, Orléans)

**11h35 - 11h50**

**Gloriane JOURAVEL** (ICOA, UMR 7311 CNRS-Université d'Orléans)

**11h50 - 12h05**

**Lucija MARKULIN** (LBLGC, EA1207, Université d'Orléans)

**12h05 - 13h45**

**REPAS**

**SESSION 7** Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549 - Modérateurs : *Catherine Belzung et Florian Guillou*

**13h45 - 14h00**

**Lucille BURGER** (Cerca, VIME, UMR 7295 CNRS-Université de Tours et de Poitiers)

**14h00 - 14h15**

**Charlotte RIEUX** (CBM, UPR4301 CNRS, Orléans)

**14h15 - 14h30**

**Celia SAPPEI** (ICOA, UMR 7311 CNRS-Université d'Orléans)

**SESSION 8** Modérateur : *Christian Andrès*

**14h30 - 15h00**

**Thomas DUGE DE BERNONVILLE** (BBV, EA2109, Université de Tours)

**15h00 - 15h30**

**Philippe LANOTTE** (ISP, UMR 1282 INRA-Université de Tours)

**15h30 - 15h50**

**PAUSE CAFE**

**SESSION 9** Modérateur : *Christian Andrès*

**15h50 - 16h30**

**Chantal ABERGEL** Information génomique et structurale (IGS, UMR 7256 CNRS-Université d'Aix-Marseille)

**16h30**

**CLOTURE et REMISE DES PRIX**