

Les Biosciences en Région Centre

ACTES du 27^{ème} Colloque BIOTECHNOCENTRE

*9 – 10 Octobre 2014
Seillac (Loir et Cher)*

Avec le concours du Conseil Régional du Centre



Région Centre

Christian ANDRES, Université de Tours, andres@med.univ-tours.fr - **Hélène BENEDETTI**, CBM-CNRS Orléans, benedett@cnrs-orleans.fr - **Marc BERTRAND**, Technologie Servier, marc.bertrand@fr.netgrs.com - **Christian BRETON**, UAGPF INRA Orléans, christian.breton@orleans.inra.fr – **Franck BRIGNOLAS**, Université d'Orléans, franck.brignolas@univ-orleans.fr - **Norbert BROMET**, Biotec Centre, n.bromet@gmail.com - **Bertrand CASTAING**, CBM-CNRS Orléans, castaing@cnrs-orleans.fr - **Jean-Claude CHENIEUX**, Université de Tours, chenieux@univ-tours.fr – **Jean-Louis DACHEUX**, UMR INRA CNRS Nouzilly, jean-louis.dacheux@orange.fr- **Nicolas DUBOULOZ**, Région Centre, nicolas.dubouloz@regioncentre.fr - **Francis GAUTHIER**, Université de Tours, francis.gauthier@univtours.fr – **Nathalie GUIVARCH**, Université de Tours, nathalie.guivarch@univ-tours.fr – **Michel MONSIGNY**, CNRS Orléans, monsigny@cnrs-orleans.fr – **Henri SALMON**, INRA Nouzilly, hsalmoncr@gmail.com - **Marie-Claude VIAUD-MASSUARD**, Université de Tours, marie-claude.viaud-massuard@univ-tours.fr

Présidente : **Nathalie Guivarc'h** - Mél : nathalie.guivarch@univ-tours.fr

Secrétariat : **Nathalie Riche** - Mél : biotechnocentre@sfr.fr

Chers membres, chers collègues,

C'est en qualité de présidente de BTC que j'ai le privilège de vous présenter le 27^{ème} colloque de notre association. Cette nouvelle édition s'inscrit dans la continuité de l'action menée par tous mes prédécesseurs et elle confirme aussi le changement opéré il y a maintenant trois ans d'associer de façon plus étroite à cet événement annuel au sein de notre Région, les doctorants oeuvrant dans le domaine du vivant.

Le colloque 2014 sera riche et dense. Sur les deux jours, une trentaine de conférences et une soixantaine de posters à visiter, illustreront la très grande qualité et variabilité des recherches dans notre domaine effectuées en Région. Tous, nous serons ainsi représentés, que nous soyons académiques, privés, jeune PME, étudiants....

Mais l'ouverture reste essentielle pour notre reconnaissance et enrichissement scientifique. C'est pourquoi je remercie très vivement tous nos collègues extérieurs à la Région d'avoir si rapidement accepté de venir présenter leurs travaux à ce public hétérogène. Car c'est bien là le propre de ce rendez-vous, et la mission de Biotechnocentre : rassembler la diversité disciplinaire des sciences du vivant pour ensemble échanger et ouvrir nos horizons. De la diversité peut émerger des projets originaux et engendrer des changements profonds. J'espère que nos collègues invités apprécieront cette approche et qu'ils se feront les portes paroles du dynamisme et de la qualité de la recherche qui se fait au sein de notre Région.

Je tiens ici à remercier vivement le conseil de la Région Centre de son soutien sans faille à notre association depuis plus de 27 ans, sans qui cet événement ne pourrait avoir lieu. Je remercie aussi l'ensemble des organismes publics et partenaires privés qui contribuent également au soutien de Biotechnocentre : ce colloque est avant tout le votre et se fait votre tribune !

Je vous souhaite à toutes et tous un excellent moment scientifique dans la convivialité et l'échange !

Bienvenue au 27^{ème} colloque de Biotechnocentre

Nathalie Guivarc'h
Présidente de Biotechnocentre

Résumés des Conférences	page 5
Résumés des Posters	page 34
Index des Auteurs	page 94

CONFÉRENCES

1 – Etudes structurales des machineries de réparation de l'ADN	
<i>Jean-Baptiste CHARBONNIER</i>	p5
2 – Combining medicinal chemists expertise and in silico methods to discover novel kinase inhibitors	
<i>Pascal BONNET</i>	p6
3 – Contrat Région centre : Niche leucémique & métabolisme oxydatif	
<i>Olivier HERAULT</i>	p7
4 – Etude du métabolisme énergétique mitochondrial dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux anthracyclines et leur chimiosensibilisation par les AGPI n-3	
<i>Julie DARTIER</i>	p8
5 – Caractérisation moléculaire de l'interaction entre le b-arrestine et différentes kinases : vers un nouveau mécanisme de signalisation des RCPGs ?	
<i>Flavie LANDOMIEL</i>	p9
6 – Description anatomo-fonctionnelle de la PAG : traçage de voie et IRM de perfusion	
<i>Ophélie MENANT</i>	p10
7 – L'agriculture de demain : moins de « chemicals » et plus de « biochemicals » ?	
<i>Guillaume BECARD</i>	p11
8 – Candida: ces levures qui nous veulent aussi du bien	
<i>Nicolas PAPON</i>	p12
9 – Contrat Région Centre: variabilité de l'activité antibactérienne de l'oeuf et valorisation des oeufs clairs	
<i>Yves NYS</i>	p13
10 – Extrapolation de l'in vitro à l'in vivo	
<i>Alain DUFOUR</i>	p14
11 – LL-37 : un peptide antimicrobien à la fois substrat et inhibiteur de cathepsines	
<i>Pierre-Marie ANDRAULT</i>	p15
12 – Sensibilité à l'insuline des transporteurs de glucose GLUT1, -8 et -12 dans le muscle de l'oiseau	
<i>Edouard COUDERT</i>	p16
13 – Subcellular localization of farnesyl diphosphate synthases and cis-prenyltransferases sheds light on the pivotal role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis	
<i>Emilien FOUREAU</i>	p17
14 – Microscopie à force atomique : de la molécule à la cellule vivante	
<i>Frédéric EGHIAIAN</i>	p18
15 – Modélisation mathématique de la croissance des plantes	
<i>Paul Henri COURNEDES</i>	p19
16 – Fonction et évolution d'un virus impliqué dans une interaction hôte-parasite entre insectes	
<i>Elisabeth HUGUET</i>	p20

17 – Contrat Région Centre : vectorisation combinée de chimiothérapeutiques et d'acides nucléiques par des liposomes gazeux pour une délivrance assistée par ultrason	
<i>Chantal PICHON</i>	p21
18 – Ces microbes qui nous gouvernent	
<i>Joël DORE</i>	p22
19 – Dosage quantitatif de routine des protéines membranaires cellulaires par HPLC-Masse (MS2plex) : avantages et contraintes	
<i>Yann COURBEBASSE</i>	p23
20 – L'épitope mapping : identifier les sites de liaison des anticorps sur leurs antigènes cibles	
<i>Eric MAURER</i>	p24
21 – Délivrance de siRNA dans les métastases pulmonaires par des lipopolyplexes ciblés	
<i>Marie GOSSELIN</i>	p25
22 – Etude des processus de dispersion de <i>MONOCHAMUS galloprovincialis</i>, vecteur du nématode de pi : le rôle potentiel de la chaîne pyrénéenne	
<i>Julien HARAN</i>	p26
23 – Design and optimization of a simple linker for the synthesis of peptide thioester surrogates	
<i>Victor TERRIER</i>	p27
24 – Chimie des nucléosides et des nucléotides pour l'étude mécanistique et structurale d'une cible biologique impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane	
<i>Mélanie ETHEVE-QUELQUEJEU</i>	p28
25 – Pathologies de l'appareil locomoteur	
<i>Hechmi TOUMI</i>	p29
26 – Formulation et réponse cellulaire de nanosondes magneto-plasmoniques pour l'imagerie bimodale IRM-SERS	
<i>Ambre CARROUEE</i>	p30
27 – Analyses de mutants de la protéine de capsid du clone JFH-1 du virus de l'hépatite C et détermination des résidus cruciaux pour la morphogénèse et la sécrétion des particules virales infectieuses	
<i>Loïc ETIENNE</i>	p31
28 – Un système toxine/antitoxine impliqué dans la stabilité de SGI1	
<i>Kevin HUGUET</i>	p32
29 – Imagerie bi-modale IRM-CT des gros animaux sur la plateforme CIRE	
<i>Hans ADRIAENSEN</i>	p33

Etudes Structurales des Machineries de Réparation de l'ADN

Jean-Baptiste CHARBONNIER

*Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie,
UMR 8221, CEA, CNRS, Univ Paris Sud, CE Saclay, 91191 Gif-s-Yvette*

L'ADN de tout organisme vivant subit des dommages dont l'impact peut être plus ou moins fort sur la structure en double hélice. Différentes voies de réparation prennent en charge, autant qu'elles le peuvent, ces dommages tout au long de la vie de la cellule. Ces voies de réparation utilisent un ensemble de protéines qui sont en charge notamment de (i) la reconnaissance de ces dommages au sein d'un large ensemble de bases non-endommagées, (ii) l'incision et l'excision spécifiquement du brin d'ADN endommagé et (iii) la re-synthèse et ligature d'un nouveau brin.

Les études structurales par cristallographie, RMN, microscopie électronique et SAXS ont permis de mieux comprendre ces 15 dernières années les bases moléculaires de ces trois étapes pour les différentes voies de réparation et dans les différents règnes du vivant. Il apparaît aujourd'hui que ces voies de réparation sont relativement bien orchestrées depuis la reconnaissance du dommage jusqu'à la ligature du brin re-synthétisé. Ce mécanisme continu peut provenir d'un ballet des protéines de réparation sur le dommage ou du recrutement de machinerie multi-protéique possédant plusieurs activités enzymatiques.

Au cours de cette présentation, nous présenterons quelques-uns des travaux majeurs de ces dernières années dans le domaine ainsi que les travaux du laboratoire sur les voies de réparation des mésappariements de l'ADN et de réparation des cassures double-brin de l'ADN.

Gueneau E, Dherin C, Legrand P, Tellier-Lebegue C, Gilquin B, Bonnesoeur P, Londino F, Quemener C, Le Du MH, Márquez JA, Moutiez M, Gondry M, Boiteux S, Charbonnier JB. Structure of the MutLα C-terminal domain reveals how Mlh1 contributes to Pms1 endonuclease site. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Apr;20(4):461-8. (MMR)

Dherin C, Gueneau E, Francin M, Nunez M, Miron S, Liberti SE, Rasmussen LJ, Zinn-Justin S, Gilquin B, Charbonnier JB, Boiteux S. Characterization of a highly conserved binding site of Mlh1 required for exonuclease I-dependent mismatch repair. *Mol Cell Biol.* 2009 Feb;29(3):907-18. (MMR)

Ropars V, Drevet P, Legrand P, Baconnais S, Amram J, Faure G, Márquez JA, Piétrement O, Guerois R, Callebaut I, Le Cam E, Revy P, de Villartay JP, Charbonnier JB. Structural characterization of filaments formed by human

Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12663-8. (Cassures double-brin)

Malivert L, Ropars V, Nunez M, Drevet P, Miron S, Faure G, Guerois R, Mornon JP, Revy P, Charbonnier JB, Callebaut I, de Villartay JP. Delineation of the Xrcc4-interacting region in the globular head domain of cernunnos/XLF. *J Biol Chem.* 2010 Aug 20;285(34):26475-83. (Cassures double-brin)

Combining medicinal chemists expertise and *in silico* methods to discover novel kinase inhibitors

Pascal BONNET

Structural Bioinformatics and Chemoinformatics, ICOA, UMR 7311 University of Orléans-CNRS, 45067 Orléans, France

Protein kinases are therapeutic targets involved in many diseases particularly in cancer and inflammation. With the first kinase inhibitor drug approved by the FDA in 2001, and the recent success of 5 drugs approved on average per year since 2011, the identification of novel kinase inhibitor is still an active research field in drug discovery. Biologists, medicinal and computational chemists, pharmacologists, clinicians, etc. are closely working together in almost all drug design projects. The large number of available data in the public domain such as biological activities, crystallographic information and compound chemical structures offers great opportunities for ligand-based and structure-based drug design. *In silico* tools are regularly applied in early discovery to identify IP free scaffolds, to predict mode of binding of a series, to optimize biological activity of ligands, to improve selectivity of a lead or to circumvent ADMETox issues. Amongst the *in silico* tools used in kinase research are virtual screening, QSAR modelling, docking, molecular dynamics simulations, chemoinformatics, etc. In this presentation, I will provide examples where medicinal and computational chemist expertise has been efficiently applied to advance the design of potent and selective kinase inhibitors.

Niche leucémique et métabolisme oxydatif

Olivier HERAULT

CNRS UMR 7292 Equipe LNOx, Université de Tours

Several studies suggest that reactive oxygen species (ROS) levels must be managed to maintain hematopoietic stem cells (HSC) quiescence. Indeed it appears that an “ideal” (and relatively low) level of intracellular ROS exists in normal HSCs, and controlled fluctuations in ROS levels may govern the self-renewal and proliferative capacity of these cells. Unregulated increases (or decreases) in ROS lead to significant alterations in HSC function. This sensitivity of HSCs to high levels of ROS may partly explain the observation that HSC niches tend to be located in the most hypoxic regions of the bone marrow. Furthermore, HSCs appear to have adapted their metabolic activity to suit this hypoxic environment, and in so doing may avoid increased mitochondrial ROS production that may otherwise occur under hypoxic conditions. We demonstrated that the ROS scavenger glutathione peroxidase 3 (GPX3) determines the competitiveness of normal and leukemic stem cells. *Gpx3* was identified as a critical determinant for the self-renewal of normal HSCs and they found that expression levels of GPX3 positively correlate with leukemia stem cell frequency in a series of *Hoxa9+Meis1* induced leukemia. Moreover, the interactions of leukemic cells with their supportive microenvironment may control the redox metabolism of the leukemic cells, and we recently established that mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) control the GPX3/ROS/p38MAPK axis. By modeling *in vitro* the interactions between human leukemic cells and primary human bone marrow MSCs, we clearly observed in MSC-anchored leukemic cells: (1) the overexpression of GPX3 (gene and protein), (2) the high decrease in the ROS level and (3) the inactivation of p38 MAPK. Concomitantly, we found a decrease in proliferation, a cell cycle arrest and an increased number of quiescent leukemic cells (G0 phase). Our results establish that the bone marrow microenvironment of leukemia regulate the aggressiveness of leukemic cells by controlling their redox metabolism and offer opportunities for new therapeutic strategies targeting these interactions microenvironment / leukemic cells.

Etude du métabolisme énergétique mitochondrial dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux anthracyclines et leur chimiosensibilisation par les acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3)

¹ Julie Dartier, ^{1,2} Karine Mahéo, ¹ Elsa Lemaitre, ^{1,2} Michelle Pinault, ^{1,2} Stéphan Chevalier, ^{1,3} Caroline Goupille, ^{1,2,4} Stéphane Servais, ^{1,2} Jean-François Dumas.

¹ INSERM UMR1069, Tours - ² Université François-Rabelais, Tours - ³ CHRU Bretonneau, Tours - ⁴ Institut Universitaire de Technologie, Tours.

Plusieurs études indiquent que des modifications d'une ou plusieurs des fonctions mitochondriales (liées à la synthèse d'énergie, à la mort cellulaire ou au stress oxydant) seraient impliquées dans la chimiorésistance de certains cancers. Néanmoins les mécanismes impliqués dans le cancer du sein restent méconnus. Par ailleurs, il a été observé qu'une alimentation enrichie en AGPI n-3 tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA) est capable de contrecarrer certains mécanismes de résistance et de sensibiliser les tumeurs à la chimiothérapie. L'effet chimiosensibilisant du DHA pourrait être lié à son intégration au niveau des chaînes latérales des cardiolipines qui sont des phospholipides spécifiques de la mitochondrie connus pour jouer un rôle important dans les différentes fonctions mitochondriales. Notre étude avait pour 1^{er} objectif de comparer le métabolisme énergétique mitochondrial de cellules cancéreuses mammaires sensibles (MCF-7S) et résistantes à la doxorubicine (MCF-7doxR). De plus, il s'agissait d'analyser si l'effet chimiosensibilisant du DHA impliquait des changements du métabolisme énergétique mitochondrial.

Nos résultats montrent que la consommation d'oxygène mitochondriale basale est inférieure (-27%, $p < 0,01$) dans les MCF-7doxR en comparaison des MCF-7S. Parallèlement, nous observons une meilleure synthèse d'énergie (ATP) mitochondriale (+52%, $p < 0,01$) associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale non dédiée à la synthèse d'ATP (gaspillage énergétique, -67%, $p < 0,01$) dans les MCF-7doxR. Ceci résulte en une meilleure efficacité de la synthèse d'ATP (rapport ATP/O, +156%, $p < 0,001$) dans les MCF-7doxR en comparaison des MCF-7S. D'autre part, les mitochondries des MCF-7doxR accumulent 2 fois moins de doxorubicine que les mitochondries des MCF-7S ($p < 0,05$). L'inhibition de la synthèse d'ATP dans les mitochondries des MCF-7doxR est associée à une augmentation leur accumulation de doxorubicine. Quelle que soit la lignée cellulaire étudiée, nous n'observons pas d'effet significatif d'une supplémentation en DHA sur la consommation d'oxygène mitochondriale basale. Cependant, le DHA diminue spécifiquement le rapport ATP/O dans les MCF-7doxR (-36%, $p < 0,01$) au niveau de la valeur des MCF-7S.

En conclusion, nos résultats montrent que les mitochondries des MCF-7R ont une meilleure efficacité de la synthèse d'ATP et accumulent moins de doxorubicine que les mitochondries des MCF-7S. Des études d'accumulation de la doxorubicine sont en cours afin d'évaluer si le DHA, en diminuant la synthèse d'ATP, affecte des pompes d'efflux mitochondriales ATP-dépendantes et augmente l'accumulation mitochondriale de la doxorubicine.

Thème : Métabolisme énergétique et cancer

Mots-clés : Acides gras polyinsaturés n-3, cancer, mitochondrie, métabolisme énergétique

Caractérisation moléculaire de l'interaction entre les β -arrestines et différentes kinases : vers un nouveau mécanisme de signalisation des RCPGs ?

Landomiel F., Bourquard T., Tranchant T., Crépieux P., Poupon A. et Reiter E.

PRC, INRA, Nouzilly, FRANCE

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires. Les β -arrestines sont des protéines d'échafaudage impliquées dans divers aspects de la fonction et de la régulation des RCPGs tels que la désensibilisation, l'internalisation et la signalisation. Notre algorithme de prédiction des interfaces moléculaires a permis d'élaborer pour la première fois un modèle d'interaction entre les β -arrestines et Src, RAF, MEK et ERK simultanément, modèle qui a été validé expérimentalement. Fait surprenant, il a été constaté que la sous-unité catalytique de PKA ainsi que p70S6K possédaient le même site d'interaction que Src sur les β -arrestines, suggérant que ces interactions pourraient être mutuellement exclusives.

En utilisant une méthode de GST pull-down alliant protéines purifiées et peptides inhibiteurs, les interactions prédites entre les β -arrestines et ses divers partenaires ont pu être validées. De cette façon, nous avons pu mettre en évidence des interactions directes entre les β -arrestines et respectivement RAF, PKA, p70S6K.

En conclusion, nous avons pu proposer un premier modèle structural pour l'échafaudage du module MAP kinase par les β -arrestines. De plus, nous avons mis en évidence l'existence probable d'une compétition entre Src, PKA et p70S6K pour un même site d'interaction, ce qui pourrait impacter la signalisation cellulaire à plusieurs niveaux. L'implication fonctionnelle de ce nouveau mécanisme est en cours d'analyse.

Description anatomo-fonctionnelle de la PAG: Traçage de voie et IRM de perfusion

O. Menant, Y. Tillet, H. Adriaensen, E. Bled, D. Girardeau, F. Cornilleau, C. Moussu, E. Chaillou

UMR PRC INRA - CNRS - Université de Tours - IFCE, Equipe «ER1 », 37380 NOUZILLY, France.

La substance grise périaqueducale (PAG) est une structure cérébrale du mésencéphale qui borde l'aqueduc de Sylvius. Des études fonctionnelles, faites principalement chez le chat et le rongeur, ont mis en évidence le rôle de la PAG dans la régulation des comportements émotionnels. En effet, il a été observé que des stimulations intra-PAG induisent des comportements de fuite ou de défense. Chez la brebis, bien que des études neuro-anatomiques ont montré qu'il existe des connexions entre la PAG et d'autres structures neuronales (bulbe olfactif, aire rétrochiasmatique, corps mamillaires...), aucune étude anatomique ou fonctionnelle ciblant la PAG n'existe à ce jour. Dans cette étude, nous proposons, dans un premier temps, de décrire les connexions neuro-anatomiques de la PAG par traçage de voie. Pour cela, deux traceurs (le Fluorogold, rétrograde et le Fluororuby, antérograde) ont été injectés dans la PAG de 12 brebis par neurochirurgie stéréotaxique. Après deux semaines de migration du traceur, les encéphales ont été prélevés et des coupes sériées ont été réalisées. L'étude des coupes immunomarquées contre le fluorogold révèle que des régions motrices (cortex moteur), sensorielle (colliculi inférieur), ainsi que de nombreuses régions impliquées dans les émotions (cortex cingulaire, aire pré-optique, aire péri-ventriculaire, PAG) projettent vers la PAG. Dans un second temps, notre objectif est de mettre en évidence un lien fonctionnel entre la PAG et des régions d'intérêt (ROIs) correspondant aux structures anatomiquement liées à la PAG observées dans l'étude de traçage de voie. Pour cela, nous avons adapté une approche *in vivo* et non invasive : l'IRM de perfusion chez la brebis anesthésiée. Après une injection vasculaire d'un agent de contraste (Gadolinium), une IRM de perfusion a été réalisée afin de déterminer les flux et le volume sanguin des ROIs qui reflètent leur activité. Le suivi de ces paramètres permettrait d'évaluer l'existence d'une corrélation d'activités entre les différentes ROIs et ainsi d'établir un lien fonctionnel entre la PAG et les régions connectées à elle.

Thème : Neurosciences / Mots-clés : FG, FR, IRM gadolinium, PAG, brebis

L'agriculture de demain: moins de "chemicals" et plus de "biochemicals"?

Guillaume BECARD

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV)
UMR 5546 CNRS/Université Toulouse 3
31326, CASTANET-TOLOSAN

La révolution verte du siècle dernier a bénéficié de progrès et développements importants réalisés dans cinq domaines: la génétique et l'amélioration des plantes, les intrants chimiques fertilisants et phytosanitaires, l'irrigation, le machinisme agricole et les politiques agricoles. Pour des raisons de coûts économiques et environnementaux trop élevés, l'emploi intensif des intrants chimiques devra nécessairement diminuer dans les prochaines décennies. Les entreprises agroindustrielles se préparent donc à investir massivement dans le développement des « biochemicals » pour remplacer progressivement les « chemicals » aujourd'hui utilisés en agriculture.

Une recherche internationale très active en biologie et microbiologie végétales vise à mieux comprendre par quels mécanismes naturels de fertilisation et de défense contre les maladies le monde végétal a pu se développer de façon si prolifique depuis plus de 400 millions d'années. Ces mécanismes permettent aux plantes de s'associer en symbiose avec des microorganismes qui améliorent considérablement leur nutrition hydrique et minérale. Ils permettent aussi aux plantes de se défendre très efficacement contre des agents infectieux grâce à leur système immunitaire basal.

Des découvertes récentes dans ces domaines qui ouvrent des portes pour le développement d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement seront exposées brièvement.

Candida : ces levures qui nous veulent aussi du bien

Tatiana A. Defosse, Emilien Foureau, Céline Mélin, Benjamin Houillé, Arnaud Lanoue, Audrey Oudin, Gaëlle Glévarec, Sébastien Besseau, Thomas Dugé de Bernonville, Olivier Pichon, Joël Crèche, Marc Clastre, Vincent Courdavault, Nathalie Giglioli-Guivarc'h et Nicolas Papon

EA2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Faculté de Pharmacie, Université François-Rabelais de Tours, France

Les levures appartenant au genre *Candida* n'ont généralement pas bonne presse aux yeux du grand public. On restreint le plus souvent ces champignons unicellulaires à *Candida albicans*, espèce pathogène bien connue des services de réanimation, d'onco-hématologie et de gynécologie-obstétrique. Toutefois, selon les techniques actuelles de diagnostic, une trentaine d'espèces de *Candida non-albicans* serait également des pathogènes opportunistes chez des individus immunodéprimés.

Par ailleurs, il ne faut pas oublier que l'incidence de ces micro-organismes sur l'homme et son environnement ne se limite pas à des aspects cliniques, elle est en réalité bien plus vaste. De nombreuses espèces du genre *Candida* trouvent à présent des applications extrêmement prometteuses dans divers domaines des biotechnologies comme la production de molécules d'intérêt (vitamines, enzymes industrielles, édulcorants) et de biocarburants, la bioremédiation, ou encore le contrôle biologique.

De nouvelles stratégies de recherche s'appuyant notamment sur les avancées en génétique moléculaire et dans les sciences « omiques », offrent aujourd'hui des pistes précieuses quant à la compréhension des mécanismes de pathogénicité des espèces opportunistes.

Les retombées de ces recherches pourraient également conduire à des approches développées en biologie synthétique en vue d'exploiter et d'améliorer le potentiel biotechnologique de certaines souches du genre *Candida*.

Thème: Biotechnologie, infectiologie

Mots clés: Levures, biomolécules, bioremédiation, contrôle biologique, pathogénicité, outils génétiques

Variabilité de l'activité antimicrobienne de l'œuf et valorisation des œufs clairs

(projet Oval des Régions Centre, Pays de Loire et Bretagne)

Yves Nys*, Sophie Réhault-Godbert, Nicolas Guyot et Joël Gautron

INRA, UR83 Recherches Avicoles, FRPO, Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf, 37380 Nouzilly, France ; *

nys@tours.inra.fr

L'œuf de poule est une enceinte close qui renferme l'intégralité des éléments nécessaires au développement et à la protection d'un embryon. C'est une réserve de nutriments et une mine de molécules aux activités biologiques diverses valorisables en santé humaine ou animale. C'est pour l'homme un aliment essentiel de haute valeur nutritive dont la qualité sanitaire doit être irréprochable. Notre objectif est de caractériser les systèmes biologiques qui contrôlent la qualité sanitaire des œufs et sa variabilité. Notre stratégie repose sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle des protéines assurant la protection de l'œuf, (1) identification des protéines de l'œuf par des approches protéomique et transcriptomique (plus de 1000 molécules identifiées) et analyse bioinformatique de leurs fonctions biologiques potentielles notamment pour révéler les protéines et peptides antimicrobiens de l'œuf, (2) étude de la variabilité phénotypique de leurs activités en fonction des conditions d'élevage (contamination bactériologique du milieu d'élevage), des conditions de stockage des œufs (température et durée) ou induite par le développement embryonnaire. Notre objectif est de définir les paramètres optimisant les défenses de l'œuf afin de protéger le consommateur des toxiinfections alimentaires et les embryons de contaminations mortelles (œufs à couver). Il est d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la valorisation non alimentaire des protéines de l'œuf. L'étape de criblage des protéines de l'œuf a été complétée par la caractérisation fonctionnelle et structurale de candidats parmi les plus prometteurs (AvBD11 et galline, ovalbumine X, antiprotéases) Nous avons mis en évidence une variabilité modérée de l'activité antimicrobienne du blanc d'œuf de poules axéniques par rapport à celles issues d'un élevage exempt de pathogènes spécifiques (SPF) ou conventionnel. Des poules vaccinées (vaccin vivant antibactérien ou antiviral) majorent faiblement leur immunité innée dans l'œuf. Nous avons par ailleurs démontré que les conditions de stockage des œufs de table ou celles d'incubation d'œufs embryonnés (température et durée) provoquaient des variations de l'activité antimicrobienne du blanc d'œuf. Le projet régional Oval avait pour objectif de valoriser les œufs clairs (œufs fertilisés mais présentant un arrêt précoce du développement, 12% environ des œufs incubés) et d'essayer de déterminer le sexe de l'embryon in ovo, certains poussins (mâle de la lignée ponte, femelles mulard) étant éliminés à la naissance. La première étape a été une tentative de mise au point d'une méthode non invasive d'imagerie par résonance magnétique de l'embryon pour repérer très précocement son sexe afin d'interrompre le développement d'animaux non valorisés (Cemagref, UMR642-INSERM). La seconde (INRA, FRPO) a été d'étudier l'activité antimicrobienne de compartiments ou fractions de l'œuf envers un panel de bactéries représentatives et d'évaluer la variabilité du potentiel antimicrobien des œufs clairs, embryonnés et non fertilisés provenant de couvoirs industriels, à différents temps d'incubation (INRA-FRPO et ISP311Centre International des Ressources Microbiennes dédié aux bactéries pathogènes-INRA). L'étape suivante a été le contrôle de la stabilité de l'activité de la fraction retenue (blanc d'œuf) lors des différentes étapes de séchage industriel pour l'obtention de poudre d'œuf. Cette fraction active est en cours d'évaluation ((UMR1079-INRA, Rennes) comme complément alimentaire pour des porcelets après sevrage et challengés par des conditions d'élevage défavorables afin de mesurer son effet sur la croissance et la santé de ces animaux.

Extrapolation de l'in vitro à l'in vivo

Alain DUFOUR

Consultant Biopharmacie, AD'MISSIONS, Paris

In the pharmaceutical industry, in vitro drug properties, pharmaceutical forms testing and in vivo pharmacodynamic-pharmacokinetic relationships are very helpful for drug formulation design and development using In vitro-in vivo correlations and predictive biopharmaceutical models. The purpose of this short communication is to present examples of approaches and models.

LL-37: un peptide antimicrobien à la fois substrat et inhibiteur de cathepsines

P. M. Andrault¹, G. Weber², Gilles Lalmanach¹ et Fabien Lecaille¹

¹INSERM UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Université François Rabelais, Tours, ²INSERM UMR 1069, Nutrition Croissance et Cancer, Université François Rabelais, Tours

Les peptides/protéines antimicrobiens (AMPs) sont altérés ou inactifs chez les patients atteints de mucoviscidose (CF), favorisant ainsi la colonisation des poumons par des bactéries opportunistes (*P. aeruginosa*, *S. aureus*) qui est une étape cruciale dans le développement de la maladie. Par ailleurs les cathepsines à cystéine humaines B, K, L et S (Cats) issues des macrophages participent, en conditions inflammatoires, à l'inactivation protéolytique de certains AMPs (SP-A, lactoferrine, β -défensines 2/3) ^(1, 2). Notre étude a porté sur la capacité des cathepsines à hydrolyser un autre peptide antimicrobien, LL-37 qui est important dans l'immunité innée. Les cathepsines de macrophages alvéolaires en particulier les Cats S et K dégradent efficacement LL-37 et inactivent son activité antimicrobienne vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. En revanche, la présence de glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) bloque de façon dose-dépendante l'hydrolyse du LL-37 par les Cats S et K. Ces résultats corroborent d'autres travaux où il a été montré que le peptide cationique LL-37 peut interagir avec différentes molécules chargées négativement (actine, ADN, GAGs) présentes en grande quantité dans le mucus des patients CF et le protéger ainsi de la protéolyse vis à vis d'autres protéases ⁽³⁾. De plus, LL-37 complexé à ces molécules anioniques perd son activité antimicrobienne. De façon surprenante, LL-37 n'est pas hydrolysé par la CatL. A l'inverse LL-37 inhibe sélectivement la CatL via un mécanisme compétitif et réversible ($K_i = 150$ nM) et cette inhibition est due principalement à des interactions électrostatiques. Les paramètres essentiels de l'inhibition de la CatL par LL-37 ont été caractérisés et une analyse bio-informatique suggère que LL-37 s'insère en position inversée par rapport à la position naturelle d'un substrat dans le site actif de l'enzyme, favorisant ainsi sa résistance à la protéolyse. De plus, nous avons identifié par mutagenèse dirigée deux résidus critiques du site actif de la CatL impliqués dans l'interaction avec LL-37 ⁽⁴⁾.

1-Lecaille et al., Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties. (2013) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (8):1701-9

2-Taggart et al., Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. (2003). *J. Immunol.* (2):931-37

3- Bergsson et al., LL-37 complexation with glycosaminoglycans in cystic fibrosis lungs inhibits antimicrobial activity, which can be restored by hypertonic saline. (2009) *J. Immunol.* (1):543-51

4- Andrault et al., The Janus face of the antimicrobial peptide LL-37 on cysteine cathepsin activity: both a efficient substrate for cathepsins S, K and a selective inhibitor of cathepsin L (article en préparation)

Sensibilité à l'insuline des transporteurs de glucose GLUT1, -8 et -12 dans le muscle de l'oiseau

Coudert E, Cailleau-Audouin E, Crochet S, Praud C, Duclos M, Tesseraud S, Métayer-Coustard S

¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly

La compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de la croissance et du métabolisme aviaire est primordiale puisque ces mécanismes sont responsables de l'efficacité des productions ainsi que de la qualité de la viande dont les propriétés technologiques sont influencées par la teneur en glycogène ante-mortem. L'anabolisme musculaire dépend de la fourniture en glucose. Chez les mammifères, l'entrée de glucose au niveau du muscle est une étape limitante qui est assurée par un transporteur spécifique : GLUT4. En réponse à l'insuline, ce transporteur migre des vésicules intracellulaires jusqu'à la membrane plasmique. La séquence codant le gène GLUT4 chez les mammifères n'est pas retrouvée au sein du génome de poulet, alors qu'un transport de glucose insulino-sensible a bien été décrit chez l'oiseau.

A ce jour, seules 2 isoformes de GLUT (GLUT1 et -8) sont identifiées au niveau du muscle chez le poulet. Nous en avons caractérisé un troisième : GLUT12. GLUT1 est considéré comme un transporteur constitutif tandis que GLUT8 et GLUT12 ont été décrits chez les mammifères comme insulino-sensibles. Par des approches *in vitro*, nous avons recherché quel(s) transporteur(s) pouva(en)t être responsables du transport insulino-sensible de glucose dans le muscle chez l'oiseau.

Seul un enrichissement de la protéine GLUT12 à la membrane plasmique de fibroblastes aviaires (lignée QT6) a pu être mis en évidence suite à une stimulation insulinique. Les protéines GLUT1 et GLUT8 n'ont pas pu être mises en évidence au niveau de la membrane dans les mêmes conditions. Cette translocation de GLUT12 est inhibée par des inhibiteurs spécifiques de la PI3Kinase. Les mécanismes de translocation semblent donc similaires à ceux décrits pour GLUT4 chez les mammifères. Un transport de glucose est observé au même temps de stimulation sans que l'expression ou la quantité des trois différents GLUTs dans la cellule ne soient modifiées. GLUT-12 pourrait donc jouer le rôle de GLUT-4 au niveau des tissus insulino-sensibles aviaires.

Thème : Régulation du métabolisme glucidique

Mots clés : Muscle, transport de glucose, insuline, oiseau

Subcellular localization of farnesyl diphosphate synthases and cis-prenyltransferases shades light on the pivotal role of peroxisome in isoprenoid biosynthesis

Emilien Foureau, Nicolas Papon,
Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Marc Clastre, Vincent Courdavault

EA2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales, Université François-Rabelais de Tours, France

Terpenes, also called isoprenoids constitute the largest class of natural products, with over 22,000 different compounds identified so far. In higher plants, isoprenoids carry out numerous essential roles in plant developmental processes including respiration, photosynthesis, growth, reproduction and adaptation to environmental challenges as well as being involved in plant defense mechanisms. All isoprenoids derived from a common C5 precursor, isopentenyl diphosphate (IPP) and its allylic isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Two separate IPP-forming pathways are known to co-exist in plants: the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, which provides the precursors for the synthesis of monoterpenes and carotenoids and the mevalonic acid (MVA) pathway that synthesizes precursors for the formation of diterpenes, sesquiterpenes, phytosterols, ubiquinone, vitamin D and primary metabolites important for cell integrity. In plants the classical view of the subcellular compartmentalization of isoprenoid metabolism is based on the physical separation of biosynthetic enzymes between plastid, (MEP pathway) and cytosol/endoplasmic reticulum (MVA pathway). However, recent studies revealed that the two last MVA pathway enzymes display a peroxisomal localization raising the question of the capacity of peroxisomes to produce complex isoprenoids.

As a consequence, we extended the study of subcellular localization to other isoprenoid enzymes of *Arabidopsis thaliana* by using biolistic-mediated transformation of plant cells and GFP imaging procedures. We first established that the long isoform of farnesyl diphosphate (FPP) synthase was targeted to mitochondria while the short isoform, deprived of the 41 first residues was located to peroxisomes, reinforcing the role of this organelle in isoprenoid biosynthesis. In addition, the systematic analysis of the subcellular distribution of the nine members of the cis-prenyltransferase (CPT) family involved in the biosynthesis of complex isoprenoid compounds revealed that besides targeting of CPT to plastids, endoplasmic reticulum, cytosol and lipid globules, the CPT8 isoform was targeted to peroxisomes. On the basis of these results, we propose a new model of the subcellular architecture of isoprenoid biosynthesis in plants which peroxisomes play a pivotal role in the production of both isoprenoid precursors and complex isoprenoid compounds.

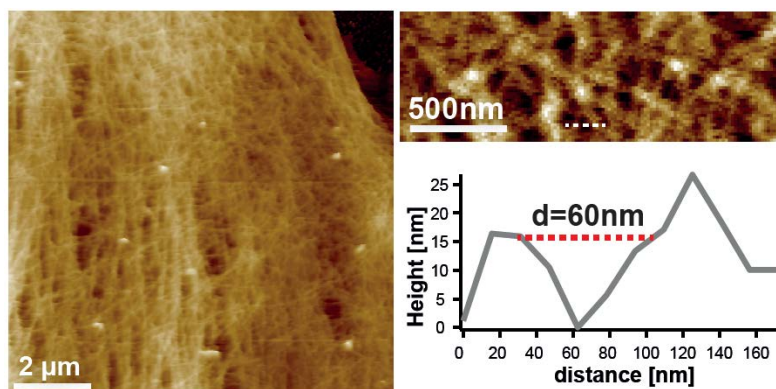
Mots clés: terpene, isoprenoids, farnesyl diphosphate synthase, cis-prenyltransferase, GFP imaging

Atomic force microscopy of biological membranes: from molecules to living cells

Frédéric EGHIAIAN

Bio-AFM lab U1006 INSERM / UNIVERSITE AIX-MARSEILLE Parc Scientifique et Technologique de Luminy Bâtiment
Inserm TPR2 bloc 5 163 avenue de Luminy 13009 Marseille France

Recent technological breakthroughs have endowed Atomic Force microscopy with the capacities to self-sufficiently perform dynamic imaging at nanometer-resolution and mechanical manipulation on biological objects (*Ando et al, Chem Rev 2014*). The activity of our laboratory focusses on nanometer-resolution imaging as well as measurements of the mechanical stability of membrane proteins in extracted biological membranes or in reconstituted systems. With the advent of faster atomic force microscopes and their combinations with optical microscopy, we hope to obtain insights into the organization and dynamics of membrane proteins within more complex systems such as living cells. We were recently able to capture the dynamics of aquaporin-0 arrays at the surface of lens cells with a 1s acquisition rate (*Colom et al, Nature Comm 2013*). We implemented methods to perform reproducible, high-resolution nanomechanical mapping of living cells. In particular, my work recently established simultaneous imaging and mechanical mapping of the cytoskeleton of eukaryotic cells with a lateral resolution of 60nm (*Eghiaian et al, in revision*). The dynamics of the cell cortex were resolved down to a 7s acquisition rate. We describe the structural and dynamical determinants of the mechanical heterogeneity in the cortex at the subcellular level, and take advantage of our method to unveil relationships between cellular forces and cytoskeletal dynamics in the context of intercellular junctions.



Eghiaian et al, in revision in Biophysical Journal

Modélisation mathématique de la croissance des plantes

Paul Henri COURNEDES

Ecole Centrale Paris - Laboratoire MAS - DigiPlante

Nous montrerons comment la modélisation mathématique de la croissance des plantes ouvre de nouvelles voies de compréhension de l'interaction génétique - environnement, et quelles peuvent en être les applications pour l'agriculture, la gestion des forêts et la protection de l'environnement.

Fonction et évolution d'un virus impliqué dans une interaction hôte-parasite entre insectes

Elisabeth Huguet, Germain Chevignon, Sébastien Moreau, Annie Bézier, Jean-Michel Drezen

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, Université F. Rabelais, CNRS 7261, Parc Grandmont, 37200 Tours

Les insectes parasitoïdes effectuent leur développement larvaire aux dépens d'hôtes arthropodes dont ils se nourrissent. Ce mode de vie est répandu chez les insectes, en particulier chez les Hyménoptères, ordre qui représente à lui seul environ 80 % des insectes parasitoïdes.

Les guêpes endoparasitoïdes pondent leurs œufs à l'intérieur des hôtes insectes. Chez ces guêpes, le succès parasitaire dépend principalement de leur capacité à échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et à réguler sa physiologie. Des pressions évolutives très fortes agissent sur les partenaires car l'issue du parasitisme se traduit par la mort du parasite ou de l'hôte. Ces guêpes endoparasitoïdes ont ainsi développé au cours de l'évolution des stratégies leur permettant de se développer à l'intérieur d'un hôte hostile. Chez la plupart des guêpes étudiées, des facteurs maternels sont injectés dans l'hôte lors de l'oviposition et contribuent collectivement, par leur action sur différents aspects de la physiologie de l'hôte, à la survie des oeufs du parasite. Une des stratégies les plus originales consiste à introduire dans le corps de l'hôte des particules virales de type polydnavirus (PDV). Ces polydnavirus ont un génome intégré dans le génome de la guêpe parasite. Ils sont produits dans les ovaires de l'hyménoptère et sont injectées lors de la ponte dans l'insecte hôte lépidoptère. Les gènes de virulence des PDV sont impliqués dans l'arrêt du développement et l'immunosuppression de l'hôte. Ces polydnavirus constituent ainsi de véritables vecteurs de transfert de gènes utilisés par les guêpes parasites pour introduire des gènes de virulence dans les chenilles qu'elles parasitent.

A l'heure actuelle les recherches sur ces interactions hôtes-parasitoïdes se concentrent sur l'origine, la nature et l'évolution des polydnavirus associés aux guêpes parasitoïdes, ainsi qu'à leur fonction et la recherche de leurs cibles dans l'insecte hôte. Toutes ces questions, mis à part leur intérêt fondamental pour la compréhension des interactions hôtes-parasites de façon générale, ont aussi un intérêt agronomique pour l'utilisation de ces insectes en lutte biologique et pour la recherche de nouvelles molécules spécifiques dans la lutte contre les insectes hôtes ravageurs. D'autre part, les PDV étant des vecteurs naturels de transfert de gènes, ces virus pourraient permettre l'émergence d'une nouvelle source de vecteurs utilisables en thérapie génique.

Je présenterai les travaux et les approches de l'équipe qui permettent de caractériser l'origine, l'évolution et la fonction de PDV.

E.A. Herniou, E. Huguet, J. Thézé, A. Bézier, G. Periquet and JM Drezen. (2013) When parasitic wasps hijacked viruses : genomic and functional evolution of polydnaviruses. *Philos Trans R Lond B Biol Sci.* Aug 12 ; 368 (1626) :20130051

G. Chevignon, J. Thézé, S. Cambier, J. Poulain, C. Da Silva C, A. Bézier, K. Musset, S.J. Moreau, JM. Drezen JM, E. Huguet. (2014) Functional annotation of *Cotesia congregata* Bracovirus : identification of viral genes expressed in parasitized host immune tissues. *J Virol.* 2014 Aug 15;88(16):8795-812.

Vectorisation combinée de chimiothérapeutiques et d'acides nucléiques par des microbulles de gaz pour une délivrance assistée par ultrasons

Anthony Delalande, Patrick Midoux et Chantal Pichon

Centre de Biophysique Moléculaire-UPR4301 CNRS affilié à l'Université d'Orléans- Orléans.

L'utilisation des ultrasons a débuté avec la découverte de la piézoélectricité permettant ainsi les débuts de l'imagerie sous-marine avec les sonars. Cette technologie a ensuite très rapidement évolué vers l'imagerie médicale à des fins diagnostiques. Il y a une vingtaine d'années, leur utilisation s'est tournée vers des applications thérapeutiques pour les troubles musculo-squelettiques principalement.

Aujourd'hui nous entrons dans une nouvelle ère, celle de la théranostique ce néologisme contractant les mots thérapeutique et diagnostique est dans de nombreuses bouches. En effet, la société se tourne de plus en plus vers une médecine à la carte et ces nouvelles technologies y contribuent. L'invention des microbulles de gaz comme agent de contraste ultrasonore a été le déclencheur d'un grand nombre d'études sur la délivrance de molécules dans une cellule en couplant ultrasons et microbulles de gaz. Cette technique appelée sonoporation a pour avantage de pouvoir délivrer localement les actifs grâce à l'incorporation des molécules à délivrer autour ou dans la membrane de la microbulle. La microbulle de gaz va donc servir d'antenne à ultrasons et de réservoir à médicaments. Les molécules capables d'être délivrées par cette technique sont principalement tous les types d'acides nucléiques ainsi que les molécules lipophiles. Les acides nucléiques sont couplés aux microbulles de gaz cationiques par interactions électrostatiques tandis que les molécules lipophiles sont intégrées dans la membrane lipidique de la microbulle de gaz. Nous avons développé des microbulles de gaz capables de délivrer à la fois un agent cytotoxique, le Paclitaxel et des ARN interférence pour favoriser une régression de la tumeur. En parallèle, nous avons mis au point un dispositif expérimental *in vitro/in vivo* permettant une sonoporation complètement automatisée et calibrée.

Des microbulles ont été développées avec des lipides cationiques originaux capables de lier des acides nucléiques et de former des microbulles de gaz stables. Ces microbulles peuvent être également chargées en Paclitaxel. La concentration de Paclitaxel incorporé modifie considérablement leur taille et leurs propriétés acoustiques. Des mesures *in vitro* ont permis d'observer le comportement de ces microbulles en présence de cellules tumorales après activation ultrasonore. Il en résulte que les ultrasons permettent aux microbulles chargées en Paclitaxel d'interagir spécifiquement avec les cellules environnantes. La preuve de concept a été validée en utilisant un modèle murin orthotopique de tumeur mammaire. Les formulations développées ont été injectées par voie intraveineuse et activées par ultrasons au niveau du site de la tumeur. Ce traitement réalisé trois fois à une semaine d'intervalle a permis de ralentir de 51% la croissance tumorale.

En conclusion, ce projet a permis de démontrer la possibilité d'exploiter des lipides cationiques originaux pour fabriquer des microbulles de gaz stables pouvant en même temps être chargées en Paclitaxel et se lier à un ARN interférence. La poursuite de ces travaux auront pour but d'effectuer des études de perfusion des microbulles par échographie de contraste afin d'ajuster au mieux le protocole de délivrance dans la tumeur.

Ces microbes qui nous gouvernent

Joël DORE

Dosage quantitatif "de routine" des protéines membranaires cellulaires par HPLC-Masse (MS2plex): Avantages et contraintes

Yann COURBEBASSE

Société Bertin Technologie

Le développement ou l'optimisation de méthodes quantitatives et sensibles de dosage des protéines membranaires cellulaires a fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années (1,2). Sur la base des critères standards de validation (spécificité, sélectivité, sensibilité, précision, robustesse, justesse, exactitude), les techniques de dosages de protéines membranaires par chromatographie en phase liquide (CLHP) couplé avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle (TQ) ont été parmi les plus optimisées. Une méthode référence de dosage multiplex des protéines membranaires cellulaires par CLHP-Masse a été décrite et publiée par Terasaki *et al* (3). Dans cette méthode (MS2Plex®), les protéines membranaires cellulaires sont préalablement partiellement purifiées et concentrées puis protéolysées par un cocktail d'enzymes afin de libérer des « peptides signatures » (surrogate peptides) spécifiques et sélectifs de ces protéines membranaires. Le dosage quantitatif de ces « peptides signatures » est ensuite réalisé par CLHP-Masse. Si le choix de ces peptides signatures et de leurs séquences doit satisfaire à des critères strictes (4), la composition du système protéolytique (cocktail d'enzymes) permettant leur production quantitative dans les matrices tissulaires ou cellulaires est bien moins établie ainsi que les conditions de préparation des fractions semi-purifiées et concentrées cellulaires/tissulaires (microsomes, fractions membranaires cytoplasmique, fraction membranaire totale) dans lesquelles seront réalisées ces dosages. De la même façon si les quantités d'échantillon nécessaires à la réalisation de ces dosages dépendent directement de la cellularité tissulaire, la viabilité et la différenciation des cellules impactent beaucoup sur la sensibilité ou la spécificité de cette méthode.

Malgré ces limites, cette technique est maintenant utilisée « en routine » pour doser en mode multiplex certaines protéines membranaires particulièrement impliquées dans le métabolisme (CYP450) ou le passage actif intra-tissulaire ou intracellulaire (transporteurs d'influx ou d'efflux) de principes actifs pharmaceutiques ou pour quantifier dans d'autres cas leurs cibles pharmacologiques (protéines membranaires impliquées dans la régulation de processus pathologiques). Ces dosages multiplex permettent de doser jusqu'à 9 protéines par run et par échantillon et donc d'établir des profils protéiques souvent bien plus précis et relevant que les dosages d'une protéine particulière. Pour autant, si l'établissement des taux relatifs de protéines membranaires cellulaires (profil protéique) permet de compenser certaines limites de cette méthode, le choix et la quantification de biomarqueurs additionnels capables de préciser l'état cellulaire ou tissulaire de l'échantillon devrait permettre d'optimiser ces « dosages » précis et quantitatifs en « estimations » précises et pertinentes.

- (1) Prasad B and Unadkat JD. *AAPS J.* **2014**,16,(4),634-648.
- (2) Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Sato A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, and Terasaki T. *Drug Metab. Dispos.*, **2012**, 40,(1), 83-92.
- (3) Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, Sekine Y, Uchida Y, Ito S and Terasaki T. *Pharm. Res.* **2008**, 25, 1469-1483.
- (4) Ohtsuki S, Uchida Y, Kubo Y, Terasaki T. *J Pharm Sci.* **2011**, 100,(9), 3547-3559

L'épitope mapping : identifier les sites de liaison des anticorps sur leurs antigènes cibles

Eric MAURER¹

¹Société Agro-Bio, 2 allée de la Chavannerie, 45240 La Ferté Saint-Aubin. France

La cartographie des épitopes ou « epitope mapping » consiste à déterminer de manière précise les épitopes reconnus par les paratopes des anticorps. Les applications de cette approche sont nombreuses, notamment dans le domaine thérapeutique, car l'identification du site ou des sites d'interactions d'un anticorps neutralisant, fournit une base pour la conception rationnelle de vaccins. Pour atteindre ce résultat, différentes approches de cartographie épitopique ont été décrites. Au sein de la société Agro-Bio, le séquençage de l'épitope est réalisé à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF/TOF. Notre procédure opératoire consiste en la formation d'un complexe anticorps-antigène immobilisé, qui est ensuite soumis à la protéolyse par différentes protéases adaptées à chaque protéine d'intérêt. La partie de l'antigène en contact avec l'anticorps, qui est protégée contre la protéolyse, est ensuite identifiée par spectrométrie de masse. De plus, lorsque la structure 3D de la protéine d'intérêt est connue, les résultats obtenus sont confrontés à la topographie des peptides accessibles à la surface de la molécule. En utilisant cette approche, nous avons été capables dans le cadre de plusieurs projets internes ou externes, de définir les épitopes de plusieurs anticorps monoclonaux. La société Agro-Bio est ainsi capable de vous accompagner de la production de vos anticorps à leurs caractérisations.

Thème : Immunologie

Mots clés : Anticorps, épitope, spectrométrie de masse, protéolyse

Délivrance de siRNA dans les métastases pulmonaires par des lipopolyplexes ciblés.

Gosselin MP, Ezzine S., Gonçalves C., Baril P., Pichon C. et Midoux P.

Les siRNA sont des petits ARN double brins, qui suscitent un grand intérêt dans le domaine thérapeutique de par leur faculté à inhiber spécifiquement l'expression de gènes cibles, notamment ceux impliqués dans le développement des cellules cancéreuses. Ces molécules nécessitent une vectorisation pour faciliter leur délivrance aux cellules cibles. Pour ce faire, nous utilisons des lipopolyplexes (LPRI) capables de cibler les cellules 4T1, un modèle murin de tumeur et de métastases du cancer du sein. Les LPRI sont des complexes ternaires composés de liposomes cationiques, d'un polymère cationique et de siRNA. Les liposomes que nous préparons sont constitués de lipophosphoramidates imidazolylés, des lipides faiblement toxiques possédant une structure bioinspirée des phospholipides membranaires. Les cellules 4T1 sont ciblées grâce à des systèmes d'adressage situés sur le liposome du LPRI. Nous utilisons 2 méthodes de ciblage : le greffage de peptides sur le liposome avec les peptides uPA ou RGDc, ou l'incorporation d'un lipide commercial couplé à l'acide folique. Ces systèmes sont respectivement reconnus par le récepteur uPAR, les intégrines $\alpha v \beta 3$ et le récepteur à l'acide folique. Tous ces récepteurs sont surexprimés dans cette lignée cellulaire et permettent d'augmenter l'endocytose des LPRI. Après délivrance de LPRI PEGylés non ciblés-siRNA luciférase, nous mesurons une inhibition de l'expression d'environ 30% sur les cellules 4T1 exprimant la luciférase. Grâce aux LPRI PEGylés et ciblés par l'acide folique nous augmentons cette efficacité d'inhibition d'environ 50%. Dans un deuxième temps, les LPRI non ciblés ont été utilisés pour vectoriser des siRNA thérapeutiques *in vitro* sur les cellules 4T1. La surexpression de la survivine est corrélée avec l'inhibition de l'apoptose et une augmentation de la prolifération cellulaire. La délivrance de 200 nM de siRNA-survivine permet de diminuer la viabilité cellulaire d'environ 30%. Par la suite, cette même expérience sera réalisée en utilisant les LPRI ciblés afin d'augmenter cette toxicité. Dans un dernier temps, les LPRI-siRNA seront délivrés *in vivo* dans les métastases pulmonaires chez la souris. Après délivrance par instillation intratrachéale, des résultats préliminaires ont montré que les LPRI-siRNA sont localisés dans les poumons pendant une période d'au moins 24h. Enfin, l'efficacité de délivrance *in vivo* de siRNA sera recherchée dans des métastases pulmonaires 4T1-Luc en utilisant des siRNA anti-luciférase vectorisés dans les LPRI ciblés.

Thème : thérapie génique des métastases pulmonaires

Mots-clés : lipopolyplexes, siRNA, métastases pulmonaires

Etude des processus de dispersion de *Monochamus galloprovincialis*, vecteur du nématode du pin : le rôle potentiel de la chaîne pyrénéenne

Julien HARAN, Christelle ROBINET, Alain ROQUES, Géraldine ROUX

INRA Orléans, URZF- 2163 Avenue de la Pomme de Pin 45160 ARDON, France

Les chaînes de montagnes sont des barrières naturelles à la dispersion des organismes et jouent un rôle important dans la structuration génétique des espèces. En raison de leur effet sur la dispersion, ces barrières sont également des barrières potentielles à la propagation des espèces invasives. Le nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*) est une espèce nord-américaine. Ce nématode est à l'origine de dégâts considérables dans les forêts naturelles et les plantations de pins dans ses zones d'introduction en Europe et en Asie. Depuis son arrivée au Portugal en 1999, il a rapidement colonisé une grande partie du pays et a été détecté dès 2008 en Espagne où il poursuit son expansion. La dispersion naturelle du nématode en Europe est assurée par *M. galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae), un coléoptère endémique se développant dans le bois des pins stressés.

Nous présentons dans cet exposé une étude intégrative visant à prédire l'effet d'une barrière naturelle telle que la chaîne Pyrénéenne sur la propagation de ce couple parasite/vecteur en Europe. Pour cela nous combinons une approche génétique pour estimer la dispersion « in situ » du coléoptère et un modèle de diffusion afin de prédire la propagation du nématode en fonction de ses exigences bioclimatiques et de celles de son vecteur.

Nos résultats montrent que le relief pyrénéen est une barrière partielle à la propagation de *M. galloprovincialis* et du nématode qu'il porte. Nous montrons que les altitudes plus faibles aux extrémités du relief peuvent autoriser le passage du nématode vers le reste de l'Europe.

Ces résultats ont des implications importantes en terme de stratégies de lutte contre la progression de ce pathogène. Ils permettent également de mieux cerner les processus de dispersion d'une espèce endémique au niveau d'une barrière altitudinale

Design and optimization of a simple linker for the synthesis of peptide thioester surrogates

V. Terrier, H. Adihou, M. Arnould, A. F. Delmas, V. Aucagne

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans, France

The importance of proteins in biology and medicine has inspired chemists to consider methods that bring about their synthesis for over a century. The Native Chemical Ligation reaction (NCL) plays a pivotal role in contemporary approaches, since it provides access to small proteins by coupling two unprotected peptide segments, containing a C α -thioester and an N-terminal cysteine, respectively. However, the synthesis of peptide thioesters by Fmoc-based SPPS remains a real bottleneck to expand the limits of chemical protein synthesis. Recently, a number of very promising methods that exploit an intramolecular $N \rightarrow S$ acyl shift for the in situ formation of thioesters from β -mercapto- N,N -disubstituted amides have emerged but these approaches are still impaired by the complex synthesis of the linker, the difficulty of the N -acylation of the secondary amine to introduce the first amino acid of the peptide segment, and slow kinetics of the NCL reaction.

We have developed an N -alkylcysteine-type C-terminal linker for the synthesis of peptide thioester precursors which can be readily synthesized on solid phase from inexpensive commercially available compounds. This linker is designed to promote an intramolecular assistance of the N -acylation, that is much facilitated compared to concurrent methodologies. Importantly, the assembly of the linker and its N -acylation can be fully automated on a peptide synthesizer, as we have illustrated for the 20 proteogenic amino acids. We have shown that peptides containing our linker are efficient thioester surrogates ("cryptothioesters") that can directly be used in an NCL reaction. Moreover, preliminary studies of the reaction mechanism have demonstrated that the linker design resulted in a considerable improvement of the kinetics of the NCL, through an intramolecular catalysis mechanism, which remains to be fully elucidated.

Thème : Synthèse totale de protéines

Mots-clés : Peptides, protéines, ligations chimiques, NCL, thioesters, N -benzyl-cystéine

CHIMIE DES NUCLÉOSIDES ET NUCLÉOTIDES POUR L'ÉTUDE MÉCANISTIQUE ET STRUCTURALE D'UNE CIBLE BIOLOGIQUE IMPLIQUÉE DANS LA BIOSYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE

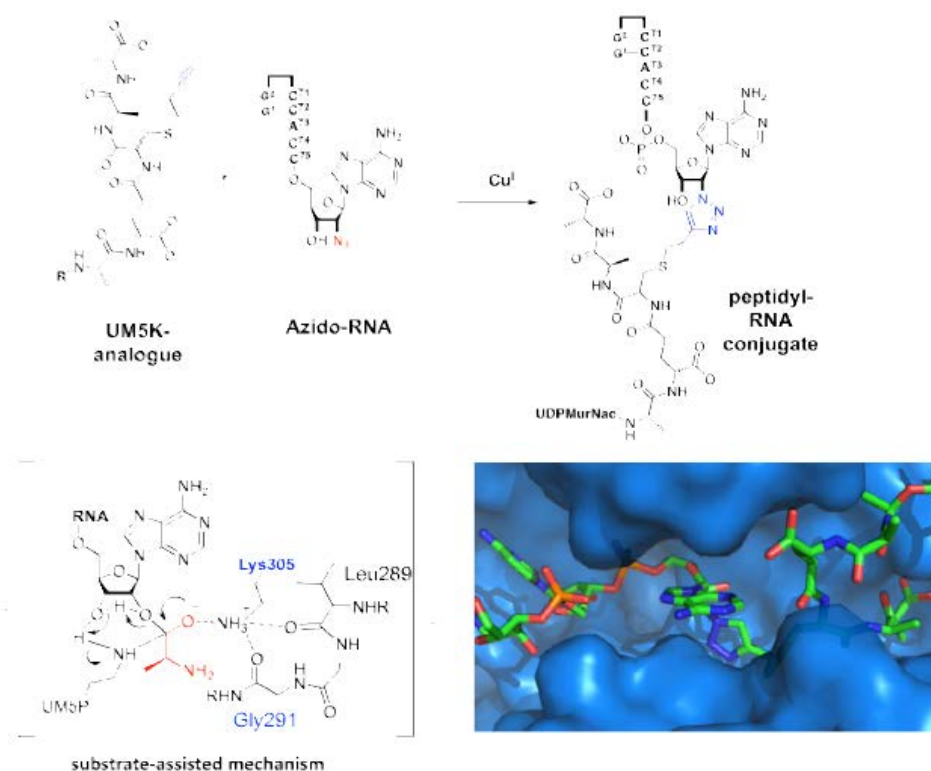
Mélanie Etheve-Quelquejeu

¹ CNRS, UMR 8601, équipe Chimie & Biologie, Nucléos(t)ides & Immunologie pour la thérapie.

E-Mail: melanie.etheve-quelquejeu@parisdescartes.fr;

<http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/umr8601/-Chimie-Biologie-Nucleos-t-ides-et-.html>

tRNA-dependent aminoacyl Fem transferases catalyze an essential step of peptidoglycan synthesis in pathogenic bacteria and are considered as attractive target for the development of novel antibiotics. FemX of *Weissella Viridescens* (FemXwv), the model enzyme of this family, transfers L-Ala from Ala-tRNA to the ϵ -amino group of L-Lys in the peptidoglycan precursor UDP-MurNAc-pentapeptide (UM5K)[1]. To gain insight into the catalytic mechanism of non-ribosomal amino acid transferases, we synthesized peptidyl-RNA conjugates[2] for co-crystallization with FemXWv. The structure of the resulting complex and mutational studies revealed the mechanism by which FemXWv binds its substrates for substrate-assisted catalysis and stabilization of the tetrahedral intermediate.[3]



References:

- [1] M. Fonvielle, M. Chemama, M. Lecerf, R. Villet, P. Busca, A. Bouhss, M. Ethève-Quelquejeu, M. Arthur, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 5115–5119.
- [2] M. Fonvielle, D. Mellal, D. Patin, M. Lecerf, D. Blanot, A. Bouhss, M. Santarem, D. Mengin-Lecreux, M. Sollogoub, M. Arthur, M. Ethève-Quelquejeu, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1357-1363.
- [3] M. Fonvielle, I. Li de la Sierra-Gallay, A. El-Sagheer, M. Lecerf, D. Patin, D. Mellal, C. Mayer, D. Blanot, N. Gale, T. Brown, H. van Tilbeurgh, M. Ethève-Quelquejeu,* M. Arthur*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 125, 7419-7422.

Pathologies de l'Appareil Locomoteur

Hechmi TOUMI

Collegium Sciences et Techniques, Université d'Orléans

L'enthèse constitue la zone d'insertion des tendons, ligaments et capsules articulaires dans l'os. Elle appartient à la fois à la structure s'insérant sur l'os et à l'os sur lequel elle s'insère, avec une histologie qui lui est propre. Son rôle est mécanique, contribuant à répartir les forces de tension sur l'ensemble de l'interface osseuse. On distingue deux types d'enthèses : l'enthèse fibreuse et l'enthèse fibrocartilagineuse qui semble plus impliquée dans les processus physiopathologiques. L'appareil locomoteur explique le grand polymorphisme clinique et radiologique de leur atteinte. À côté du vieillissement et de facteurs mécaniques, de nombreuses pathologies de mécanismes très variés peuvent altérer les enthèses dont le chef de file est la spondylarthrite ankylosante. L'étude des enthèses a fait l'objet de nombreux travaux récents. Cela a permis une meilleure compréhension de leur histologie et de leurs atteintes. L'histologie a aidé à comprendre l'atteinte de l'enthèse dans la spondylarthrite ankylosante, ce qui a permis de soulever des hypothèses physiopathologiques, les principales mettant en jeu les bactéries et l'auto-immunité. Des progrès conséquents, au cours de ces toutes dernières décennies, pour leur diagnostic leur analyse échographique et par IRM, ont permis d'éclairer sous un jour nouveau la physiopathogénie de ces rhumatismes inflammatoires. Nos travaux ont pour objectif de compléter nos connaissances dans la spondylarthrite ankylosante et dans bien d'autres pathologies.

FORMULATION ET REPONSE CELLULAIRE DE NANOSONDES MAGNETO-PLASMONIQUES POUR L'IMAGERIE BIMODALE IRM-SERS

A. Carrouée^{1,2}, E. Allard-Vannier¹, S. Mème², JC. Beloeil², I. Chourpa¹

1 : EA6295, Nanomédicaments et Nanosondes, UFR Sciences Pharmaceutiques, Université de Tours

2 : UPR 4301 – CBM - Equipe « IRM, signaux, images et expression des gènes », Campus CNRS, Orléans

L'imagerie multimodale est une nouvelle stratégie pour améliorer le diagnostic précoce des cancers. Ce travail décrit un protocole simple et rapide permettant de formuler des nanosondes (NS) hybrides qui combinent les propriétés magnétiques et optiques à l'origine de deux techniques diagnostiques: l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la diffusion Raman exaltée de Surface ou effet SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering). L'objectif de cette stratégie est d'associer une méthode très résolutive (IRM) à une méthode très sensible et molécule-spécifique (SERS). Les nanosondes sont obtenues par un assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) et de NP d'argent plasmoniques enrichies d'un fluorochrome non toxique, le Nile Blue (NB). Pour renforcer leur stabilité, ces nanosondes sont recouvertes d'une couche de chitosan qui est biocompatible et biodégradable. L'assemblage des NS dans le PBS est totalement maîtrisé ($d_H < 200\text{nm}$; $PdI < 0,3$). Leur stabilité colloïdale est confirmée jusqu'à 30 jours, ainsi que la préservation de leur signal SERS sur le plan qualitatif comme quantitatif. La réponse bimodale IRM-SERS a d'abord été démontrée à partir de gels d'agarose à 0,5% incluant des NS. Ces gels présentent un très fort signal SERS et un contraste élevé de susceptibilité magnétique (ou SWI pour Susceptibility Weighted Imaging) en IRM. Une fois en contact avec des cellules cancéreuses (lignée HeLa), les NS entrent dans les cellules et sont relativement bien tolérées (80% survie). Elles permettent la détection sensible et contrastée d'un faible nombre de cellules cancéreuses à la fois par SERS et par IRM, ce qui est un atout pour un diagnostic précoce. Ces NS représentent donc une nouvelle génération d'agents d'imagerie bimodale

Analyses de mutants de la protéine de capsid du clone JFH-1 du virus de l'hépatite C et détermination des résidus cruciaux pour la morphogénèse et la sécrétion des particules virales infectieuses.

Etienne Loïc¹, Boyer Audrey¹, Meunier Jean Christophe¹, Gaillard Julien², Blanchard-Laumonnier Emmanuelle^{1,2}, Roingeard Philippe^{1,2} et Hourieux Christophe^{1,2}.

¹ Unité Inserm U966, Morphogénèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites (MAVIVH), Université François Rabelais et CHRU de Tours.

² Plateforme R.I.O. de Microscopie électronique de l'université de Tours, Université François Rabelais, Tours.

L'étude minutieuse de la séquence de la protéine de capsid du clone JFH-1, seul génome du virus de l'hépatite C capable d'effectuer un cycle infectieux complet *in vitro*, a révélé qu'elle possédait de nombreuses singularités : en effet, par comparaison de l'ensemble des séquences disponibles dans les bases de données, nous avons identifié dix résidus très spécifiques voire exclusifs du clone JFH-1, localisés dans les 180 premiers acides aminés de cette protéine. L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'impact de ces dix résidus particuliers sur l'assemblage et la sécrétion virale, en les remplaçant dans la séquence de capsid du clone JFH-1 par leurs homologues les plus fréquemment retrouvés.

Une première étude préliminaire basée sur l'expression de protéines de capsid modifiées et visant à étudier la formation de pseudo-particules virale n'a pas permis d'identifier une contribution significative d'un ou plusieurs de ces 10 résidus pris isolément, suggérant des rôles probablement additifs de tout ou partie de ces résidus dans ces mécanismes.

Afin d'étudier cette hypothèse, ces dix résidus ont été modifiés dans la séquence de capsid du génome complet du clone JFH-1 (construction « S8 »), et évalués en comparaison du génome JFH-1 sauvage et de la chimère J6/JFH-1, cette dernière étant connue pour son haut niveau de production de particules virales infectieuses.

Après transfection en cellules HUH7.5, la construction S8 montre qu'elle permet une production élevée de particules virales infectieuses et ceci malgré des niveaux de réplication équivalents pour les trois génomes testés. L'évaluation du pouvoir infectieux n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les particules virales obtenues pour ces trois constructions. Par ailleurs, l'observation en microscopie confocale a montré que la protéine de capsid n'était pratiquement pas associée aux gouttelettes lipidiques pour la construction S8 (contrairement à JFH-1 et dans une moindre mesure à J6/JFH-1) et détectée dans pratiquement 100% des cellules transfectées (versus 30 % pour JFH-1 et 75 % pour J6/JFH-1). L'ensemble de ces résultats montrent que l'insertion de ces dix résidus très conservés dans le génome JFH-1 contribuent à un meilleur assemblage/sécrétion des particules virales et que l'association de la protéine de capsid aux gouttelettes lipidiques semble être inversement proportionnelle à la quantité de virus sécrétés et pourrait finalement être très transitoire au cours des phases de l'assemblage viral.

Un système toxine/antitoxine impliqué dans la stabilité de SGI1

Kévin Huguet¹, Axel Cloeckaert¹ et Benoît Doublet¹

¹INRA UMR ISP Equipe PGBA

La résistance aux antibiotiques est au cœur des problématiques de santé publique actuelles en raison de l'expansion de ce phénomène et de l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces. Trouver de nouveaux moyens de lutte contre la résistance est donc devenu primordial. La dissémination et la persistance des supports génétiques porteurs des résistances sont des acteurs-clés du succès de la résistance aux antibiotiques. Agir à la source sur les mécanismes d'échanges/maintiens de ces éléments génétiques dans le but de les stopper, pourrait apporter de « nouvelles armes » afin de combattre la résistance aux antibiotiques.

L'îlot génomique de multirésistance SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) a été identifié chez *Salmonella enterica* en 2000. Depuis lors, SGI1 a connu un succès épidémique mondial via l'acquisition de résistances à des thérapeutiques de premier choix et sa dissémination à d'autres genres bactériens tels que *Proteus mirabilis*. SGI1 est un élément intégratif, mobilisé en *trans* spécifiquement par les plasmides IncA/C. Récemment, la stabilité de SGI1 au sein du génome bactérien a été démontrée *in vitro* au cours du temps et des générations. Cette stabilité pourrait s'expliquer par la présence sur SGI1 d'un système capable de stabiliser cet élément génétique mobile au sein du génome.

L'opéron putatif S026-S025 de SGI1 présente une forte similitude avec un système Toxine-Antitoxine (TA) partiellement caractérisé. De manière générale, les systèmes TA représentent des systèmes d'addiction (gènes égoïstes) assurant leur propre persistance et de fait, celle de l'élément génétique qui les porte.

Les gènes S026 (antitoxine putative) et S025 (toxine putative) ont donc été clonés indépendamment dans deux plasmides d'expression. Dans ce contexte, la transformation de bactéries possédantes ou non le vecteur d'expression S026 par le vecteur d'expression S025 a démontré que l'expression de S025 est toxique pour les bactéries en absence d'expression de l'ORF S026. Ce résultat a également été confirmé en cinétique de croissance, en absence de S026 l'expression de S025 provoque un effondrement de deux logs du nombre de bactéries/ml, en seulement 45 minutes. En revanche l'expression concomitante de S026 permet une croissance normale des bactéries. Le produit de l'ORF S026 contrecarre donc l'effet toxique de la protéine S025, ceci permet donc d'affirmer que l'opéron S026-S025 encode un système toxine-antitoxine. Enfin, replacé dans son contexte naturel, la délétion de l'opéron S026-S025 (TA) de SGI1 a révélé une forte instabilité de SGI1^{ΔTA}, en présence d'un plasmide conjugatif IncA/C.

Ce système TA a certainement favorisé la dissémination et la persistance de SGI1 à travers le monde bactérien. Une fois acquis par la bactérie, SGI1 (et ses résistances) ne peut donc pas être perdu ; sa perte conduisant à la mort.

Thème : Microbiologie, Biologie moléculaire, résistance aux antibiotiques

Mots-clés : SGI1, système toxine-antitoxine, stabilité génomique, vecteurs d'expression

Imagerie bi-modale IRM-CT des gros animaux sur la plate-forme CIRE

Hans ADRIAENSEN

Plate-forme CIRE (Chirurgie et Imagerie pour la Recherche et l'enseignement)
UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements
Centre INRA Val de Loire
37380 Nouzilly
Contat : cire@tours.inra.fr

Le service d'imagerie *in vivo* de la plate-forme Chirurgie et Imagerie pour la Recherche et l'Enseignement (CIRE) vient renforcer les équipements et les compétences de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements (Centre INRA Val-de-Loire). Issue d'une réflexion commune entre l'université François-Rabelais, le centre hospitalier régional universitaire (CHRU) de Tours et l'Inra la plateforme CIRE est une structure qui regroupe les moyens de chirurgie et d'imagerie *in vivo* appliqués aux modèles expérimentaux ovins, porcins et caprins sur le centre Inra Val de Loire à Nouzilly.

Cette plate-forme d'envergure internationale permet d'offrir un service unique pour la recherche, la formation et les collaborations industrielles, dans les domaines de la santé humaine, animale et de l'élevage. Elle est composée de trois services :

- Le service de chirurgie développe des expertises en chirurgie notamment en neurochirurgie et chirurgie abdominale chez les mammifères domestiques.
- Le service de prélèvement qui réalise de nombreux prélèvements *post-mortem* sur les animaux expérimentaux.
- Le service d'imagerie *in vivo*, équipé pour l'imagerie par RMN, l'imagerie aux rayons X et l'imagerie ultrasonore.

Parmi les programmes réalisés au sein du service d'imagerie de la plate-forme CIRE, deux seront présentés.

1- Le programme européen REBORNE dont le but est d'étudier l'association de cellules souches mésenchymateuses à un biomatériau pour améliorer la consolidation osseuse après fracture. Cette étude a été menée sur brebis avant de passer en phase d'essai clinique chez l'homme. Les acquisitions du CT (Computerised Tomography) scan montrent la progression de cette consolidation au cours du temps. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) permet de suivre l'éventuelle migration des cellules souches mésenchymateuse marquées par des nanoparticules ferromagnétiques (SPIOs) au sein du tissu.

2- Le programme iFLOW, concerne l'étude de la régénération du foie après hépatectomie. Le CT scan permet de faire le calcul volumétrique du foie afin de modéliser la partie à réséquer et ainsi préparer la chirurgie, et il permet également de calculer la régénération du foie. L'IRM permet de calculer le flux sanguin de divers vaisseaux à différents endroits dans l'abdomen afin d'essayer d'en produire un modèle théorique.

POSTERS

Filière A

PA1 - Le gène *SCN4B* : un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein ?

E Bon, V Driffort, C Martinez-Caceres, P Pelegrin, M-L Cayuela, M-L Jourdan, A Moreau, E Piver, P Bougnoux, P Besson, S Chevalier, S Roger p38

PA2 - Fonctions anti et prooxydantes des protéines stat 5 dans les cellules hématopoïétiques normales et leucémiques

J Bourgeais, J Leclerc, El Pecnard, O Hérault, F Gouilleux p39

PA3 - Inhibition de la voie PKC-ERK par les acides gras polyinsaturés n-3 : une nouvelle stratégie pour lutter contre la résistance aux taxanes ?

L Chauvin, C Goupille, E Lemaître, C Blanc, P Bougnoux, S Chevalier et K Mahéo p40

PA4 - Characterization of the five cytokinin receptors in apple tree and their implications in biotic interactions

D Daudu, E Allion, N Papon, V Courdavault, A Oudin, A Lanoue, T Dugé de Bernonville, E Foureau, C Melin, S Carpin, M Clastre, M Courtois, O Pichon, M-N Brisset, E Vergne, B Le Cam, D Giron, G Mouille, S Boutet-Mercey, N Giglioli-Guivarc'h, J Crèche, S Besseau, G Glévarec p41

PA5 - Les cellules souches mésenchymateuses médullaires normales ou issues de LAM influencent l'intégrité et le cycle cellulaire des cellules leucémiques

L Desbourdes, N Ishac, E Ducrocq, O Hérault, E Gyan, J Domene p42

PA6 - Metabolic imaging in Rat Models of the ADHD-C and ADHD-PI phenotypes

E Desfosses, C Tauber, FX Lepelletier, S Chalon, P Castelnau, L Galineau p43

PA7 - Développement de médicaments radiopharmaceutiques fluores pour l'exploration en imagerie TEP de la neuroinflammation

J Elie, F Buron, R Bidault, N Arlicot, J Vercouillie, D Guilloteau, S Routier p44

PA8- Le peptide humain LL-37 augmente la migration et le calcium intracellulaire dans les cellules cancéreuses par activation du canal BKCa.

A Gambade, S Zreika, M Gueguinou, M Potier-Cartereau, S Chevalier, S Roger, C Vandier, C Goupille et G Weber p45

PA9 - New selective peptidyl di(chlorophenyl)-phosphonate esters to visualize and block neutrophil proteinase 3 in human diseases.

C Guarino, M Legowska, M Cadène, A Lesner, F Gauthier, B Korkmaz p46

PA10 - Rôle du complexe canalaire SK3/Orai1/TRPC1 dans la migration des cellules cancéreuses coliques HCT116 : effet du Cetuximab et voie Akt/Rac.

M Guéguinou, T Harnois, A Gambade, A Chantôme JP Haelters, PA Jaffrès, G Weber, P Bougnoux, N Deliot, N Bourmeyster, B Constantin, T Lecomte, C Vandier M Potier-Cartereau p47

PA11 - Activité antifongique d'oligomères et de dérivés du t-resvératrol vis-à-vis de levures pathogènes opportunistes du genre *Candida*

B Houillé, N Papon, L Boudesocque, S Besseau, V Courdavault, C Enguehard-Gueiffier, G Delanoue, L Guérin, M Clastre, N Giglioli-Guivarc'h, J Guillard, A Lanoue p48

PA12 - Stat5 et cellule souche leucémique : conception d'inhibiteurs chimiques et évaluation pharmacologique

L Juen, G Prié, F Gouilleux, C Marot, M-C Viaud-Massuard p49

PA13 - Développement de nouveaux substrats fluorescents de la MMP-12 de macrophage

A-S Lamort, R Gravier, A Laffitte, L Juliano, M-L Zani et T Moreau p50

PA14 - Optimisation de l'analyse métabolomique multimodale (RMN, GC-MS et LC-HRMS) de cultures cellulaires <u>B Madji Hounoum</u> , H Blasco, C Veyrat-Durebex, B Diémé, C Bocca, L Nadal-Desbarats, F Montigny, C R Andres, P Emond, S Mavel	p51
PA15 - Etude <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> de l'intérêt de nanocapsules de polysaccharides naturels pour l'administration cutanée de molécules actives <u>H T P Nguyen</u> , E Allard-Vannier, I Eddaoudi, M Soucé, I Chourpa, E Munnier	p52
PA16 - HS-5 et HS-27A deux lignées mésenchymateuses humaines. Sont-elles un bon modèle <i>in vitro</i> de la niche hématopoïétique? <u>N Ishac</u> , L Desbourdes, J Bourgeais, F Gouilleux, J Domenech, O Hérault, F Rouleux-Bonnin	p53
PA17 - Régulation de la synthèse hépatique des cardiolipines par TNFα et IL6 et mécanismes à l'origine des altérations bioénergétiques mitochondriales hépatiques dans la cachexie cancéreuse <u>L Peyta</u> , WA Taylor, JF Dumas, K Jarnouen, C Coulouarn, F Maillot, GM Hatch, P Loyer, S Servais	p54
PA18 - Cartographie des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps monoclonaux thérapeutiques <u>J Pottier</u> , H Watier	p55
PA19 - Baseline tumor volume affects rituximab pharmacokinetics in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) <u>M Tout</u> , G Cartron, O Casasnovas, M Meignan, G Paintaud, D Ternant	p56
PA20 - Metabolomic approach on an <i>in vitro</i> model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: an astrocytes and motor neurons co-culture exposed to oxidative stress <u>C Veyrat-Durebex</u> , P Corcia, E Piver, P Emond, A Dangoumau, P Vourc'h, D Devos, CR Andres, H Blasco	p57

Filière B

PB21 - HCV Neutralization Does Not Depend On The Neonatal Fc Receptor (FcRn) <u>A Morel</u> , C Passot, C Arnoult, E Beaumont, V Gouilleux-Gruart, P Roingeard, E Blanchard-Laumonnier	p58
PB22 - Développement d'une stratégie d'immunisation visant à induire une réponse largement neutralisante anti-VIH-1 de type PG9/PG16 et PGT121/128 <u>M Morgand</u> , E Beaumont, A Moreau, J Gaillard, P Roingeard, M Braibant, F Barin	p59
PB23 - Caractérisation des protéines Lmb de <i>Streptococcus agalactiae</i> <u>P Moulin</u> , C Cano, L Mereghetti, A Rosenau, A Hiron	p60
PB24 - Urine metabolomic profiling identifies time dependent effects of calcineurin inhibitors and reflects early graft function in kidney transplant patients <u>K Muhrez</u> , L Nadal-Desbarats, H Blasco, B Dieme, J-M Halimi, C Le Guellec	p61
PB25 - Développement d'un vaccin sous-unitaire innovant contre la toxoplasmose <u>T T L Nguyen</u> , C Ducournau, D Betbeder, I Dimier-Poisson	p62
PB26 - Characterization of the FRZ-like carbohydrate metabolic operon of <i>Streptococcus Agalactiae</i> <u>K Patron</u> , P Gilot, A Hiron, E Camiade, L Mereghetti	p63
PB27 - A Small Non-Coding RNA in <i>Streptococcus agalactiae</i> reveals a Pleiotrophic effect on Cell Morphology, Stress, and Glucose Starvation <u>MA Zorgani</u> , T Rochat, I Rosinski-Chupin, R Quentin, P Trieu-Cuot, E Jacquet, P Glaser, P Boulloc, MF Lartigue	p64

Filière C

PC28 - β-Galactosidase: a function in tension wood G-layers? A Šećerović, F Guedes, MC Lesage-Descauses, N Millet, V Lainé-Prade, F Laurans, JC Leplé, A Déjardin, G Pilate	p65
PC29 – Formulation et réponse cellulaire de nanosondes magneto-plasmoniques pour l'imagerie bimodale IRM SERS A Carrouée, E Allard-Vannier, S Mème, JC Beloeil, I Chourpa.....	p66
PC30 - Etude du récepteur 5-HT₆ de la sérotonine comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la neurofibromatose de type 1. W Deraredj, L Cobret, F Madouri, H Bénédicti, S Morisset.....	p67
PC31 - Étude des propriétés du moteur moléculaire du facteur Rho de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> F D'Heygère, A Schwartz, M Boudvillain	p68
PC32 - Native high resolution mass spectrometry for kinetics monitoring by relative quantification of non-covalent HU complexes. D Ginguéné, R Lemeur, B Castaing, C Landon, K Loth, M Cadène.....	p69
PC33 – Near infrared emitting lanthanide nanoparticles as novel imaging agents for potassium channels detection I Martinić, E Trivedi, A Chantome, C Vandier, V L Pecoraro, S V Eliseeva, S Petoud.....	p70
PC34 – Approche bimodale pour évaluer les changements précoces de l'oxygénation intra-tumorale: imagerie photo-acoustique couplée à des mesures de pressions partielles en oxygène F Raes, G Collet, C Kieda, S Lerondel, A Le Pape	p71
PC35 - Sondes luminescentes à base de lanthanides-dendrimères pour l'imagerie biologique de luminescence visible et proche-infrarouge I Nazarenko, A Foucault-Collet, CM Shade, S Eliseeva, S Petoud	p72
PC36 - GALIG, gène inducteur de la mort cellulaire dans des cellules normales et pathologiques A Serrano, M Dubois, Thierry Normand, Stéphane Charpentier, F Brule, A Legrand, L Mollet.....	p73
PC37 - Innervation et vascularisation de l'os sous-chondral dans un contexte arthrosique M Cherief, E Lespessailles, H Toumi	p74
PC38 - Subchondral Bone Changes Assessment using the Fractal Signature T Janvier, E Lespessailles, R Jennane	p75
PC39 - Effect of Beta 1.3/1.6 Glucan on chondrogenic differentiation G Larguech, M Cherief, H Toumi, E Lespessailles, R Daniellou.....	p76
PC40 - A breakthrough in the treatment of osteoarthritis: Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells M Mazor, R Coursier, E Lespessailles, H Toumi	p77
PC41 - Broad profiling prediction of protein kinase inhibitors via a Kinochemometrics approach N Bosc, C Meyer, P Bonnet	p78
PC42 – Développement de médicaments radiopharmaceutiques fluores pour l'exploration en imagerie moléculaire TEP de la neuroinflammation J Elie, F Buron, R Bidault, N Arlicot, J Vercouillie, D Guilloteau, S Routier	p79
PC43 - A free accessible workflow for preprocessing virtual screening experiments J-M Gally, N Bosc, E Pihan, R Arora, S Bourg, B Canault, P Bonnet	p80
PC44 – Marquage par ligation bio-orthogonale de cellules tumorales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> A Mongis, F Piller, V Piller.....	p81

PC45 - Influence of iron on <i>in vitro</i> IL-1β production induced by bacterial lipopolysaccharide <u>R Agaro</u> , C Mura	p82
PC46 - Neuroblasts disturbances induced by perinatal exposure to glufosinate ammonium. <u>A Herzine</u> , A Laugeray, O Richard, C Montecot-Dubourg, S Mortaud	p83
PC47 - PKC theta controls ILC2 and Th2 responses to house dust mite allergen by inhibiting NFAT1 and IRF4. <u>F Madouri</u> , P Chenuet, L Fauconnier, M Gallerand, T Marchiol, N Rouxel, A Ledru, F Erard, F Trovero, V Quesniaux, B Ryffel, D Togbe	p84
PC48 - Impact d'une contrainte osmotique sur la régulation des gènes codants des RR-B dans différents organes de peuplier. <u>I Djeghdir</u> , L Bertheau, F Chefedor, G Glévarec, D Auguin, F Héricourt, C Depierreux, D Morabito, F Brignolas, A Oudin, S Carpin	p85
PC49 - Impact d'environnements pédoclimatiques contrastés sur la méthylation de l'ADN chez le peuplier <u>Le Gac A-L</u> , Lafon-Placette C, Delaunay A, Brignolas F et Maury S	p86

Filière D

PD50 - Characterization of the adult hypothalamic neurogenic niche in sheep and influence of an environmental factor : the photoperiod <u>L Butruille</u> , M Batailler, M Migaud	p87
PD51 - Spermatogénèse et allocation spermatique chez un hyménoptère parasitoïde, <i>Nasonia vitripennis</i> <u>M Chirault</u> , L T Gohore, F Ngbondou, C Chevrier, C Bressac, C Lécureuil	p88
PD52 - Effet de la metformine sur la fonction testiculaire chez le poulet <u>Faure M</u> , Guibert E, Brillard J-P, Froment P	p89
PD53 - Les séquences répétées chez le poulet <u>S Guizard</u> , B Piegu, P Arensbürger, Y Bigot	p90
PD54 - Régulation de la synthèse de la mélatonine par les récepteurs à la mélatonine <u>J Lépinay</u> , D Gennetay, D Chesneau, P Delagrèze, C Taragnat et V Bozon	p91
PD55 - Ram seminal plasma proteome and impact on sperm liquid preservation <u>C Soleilhavoup</u> , G Tsikis, V Labas, G Harichaux, P L.Kohnke, JL Dacheux, Y Guérin, JL Gatti, S P de Graaf, X Druart	p92

Posters de participants

P56 - Exploiting <i>Catharanthus roseus</i> transcriptome resources to elucidate the biosynthetic pathway of monoterpene indole alkaloids T Dugé de Bernonville, M Clastre, S Besseau, A Oudin, V Burlat, G Glévarec, A Lanoue, N Papon, N Giglioli-Guivarc'h, B St-Pierre, V Courdavault	p93
---	-----

Le gène *SCN4B* : un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein ?

Emeline Bon^{1*}, Virginie Driffort^{1*}, Carlos Martinez-Caceres², Pablo Pelegrin², Maria-Luisa Cayuela³, Marie-Lise Jourdan¹, Alain Moreau⁴, Eric Piver⁴, Philippe Bognoux¹, Pierre Besson¹, Stephan Chevalier¹, Sébastien Roger¹
¹ Inserm UMR 1069 – Université François-Rabelais de Tours ; ² Murcia's BioHealth Research Institute, Murcia, Espagne; ³Telomerase, Cancer and Aging Group, Murcia, Espagne; ⁴ Inserm UMR966 – Université François-Rabelais de Tours

*, participation identique des auteurs

La diminution d'expression (ARNm) du gène *SCN4B*, codant pour la sous-unité $\beta 4$ des canaux sodiques, est associée au développement métastatique et à une diminution de la survie de patientes atteintes de cancer du sein. Notre étude immunohistochimique réalisée sur des tumeurs mammaires humaines montre que l'expression de la protéine $\beta 4$ est diminuée dans les tumeurs de grade élevé ainsi que dans les métastases. *In vitro*, l'extinction de l'expression de $\beta 4$ dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 augmente d'environ 150% leur invasivité à travers une matrice extracellulaire, tandis que sa surexpression la diminue de 50%. Dans un modèle d'invasivité *in vivo*, sur embryon de poisson zèbre, l'extinction de l'expression de $\beta 4$ augmente l'invasion des tissus par les cellules cancéreuses de près de 40%. L'augmentation de l'invasivité induite par la sous-expression de $\beta 4$ semble être indépendante de celle induite par l'activité des canaux sodiques $nNa_v1.5$ anormalement exprimés dans les tumeurs mammaires. Une faible expression de $\beta 4$ pourrait stimuler l'invasion non protéolytique des cellules cancéreuses. Cette étude met en évidence l'importance de $\beta 4$ dans le contrôle de l'invasivité cancéreuse et le développement métastatique, et indique que le gène *SCN4B* agit comme un gène suppresseur de tumeur. Enfin, le traitement des cellules MDA-MB-231 avec l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3), un acide gras polyinsaturé n-3 connu pour prévenir le développement métastatique, augmente l'expression de *SCN4B* de près de 100% et réduit l'invasion cellulaire de 50%. Un apport nutritionnel en acides gras n-3 pourrait donc participer à freiner l'apparition des métastases.

Thème : Cancer

Mots-clés : sous-unité auxiliaire des canaux sodiques ; invasivité cancéreuse ; métastases ; AGPI n-3

FONCTIONS ANTI ET PRO OXYDANTES DES PROTEINES STAT5 DANS LES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES NORMALES ET LEUCEMIQUES.

Jérôme Bourgeais¹, Joan Leclerc¹, Emmanuel Pecnard¹, Olivier Hérault¹, Fabrice Gouilleux¹.

¹ : Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC) - Equipe LNox CNRS : UMR7292, Université François Rabelais – Tours

Les protéines Stat5a et Stat5b sont des régulateurs importants de l'hématopoïèse précoce. Certaines données de la littérature indiquent que les niveaux d'expression et/ou d'activation de ces protéines modulent la quiescence, l'auto renouvellement, l'expansion et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines et murines. Par ailleurs Stat5 est un effecteur essentiel dans la transformation des CSH et la genèse de syndromes myéloprolifératifs induites par les oncogènes Bcr-Abl et Jak2V617F. Ces pathologies se caractérisent par la prolifération anormale et clonale des CSH qui est liée à une activation dérégulée et constitutive des protéines Stat5. Le niveau d'O₂ et/ou de ROS (Reactive Oxygen Species) module également l'activité des CSH, un faible niveau favorisant la quiescence et l'auto renouvellement et un niveau élevé favorisant l'expansion et la différenciation. Il est donc vraisemblable que les niveaux de ROS et d'expression et/ou d'activation de Stat5 convergent pour réguler le comportement des CSH normales et leucémiques. Afin d'étudier le degré d'implication des protéines Stat5 dans la régulation de la production de ROS des cellules souches hématopoïétiques normales et leucémiques, nous avons analysé l'impact d'une inhibition de l'activité et/ou de l'expression de Stat5 sur le niveau de ROS de différents types de lignées de cellules leucémiques exprimant soit une forme non phosphorylée de Stat5 soit une forme constitutivement active et phosphorylée sur tyrosine. Nos résultats suggèrent que les protéines Stat5 ont une activité anti oxydante ou pro oxydante suivant le statut de phosphorylation. Ces données mettent également en avant un rôle non canonique et canonique de Stat5 dans la régulation du niveau de ROS

Inhibition de la voie PKC-ERK par les acides gras polyinsaturés n-3 : une nouvelle stratégie pour lutter contre la résistance aux taxanes ?

L. Chauvin¹, C. Goupille¹, E. Lemaître¹, C. Blanc¹, P. Bougnoux^{1,2}, S. Chevalier¹ et K. Mahéo¹

¹ Laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer, INSERM U1069, Tours (37), France.

² CHRU, Tours (37), France

La résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie constitue une cause majeure d'échec du traitement anticancéreux. L'activation d'un signal de survie associé à la voie ERK est rapportée comme étant un des mécanismes de résistance aux taxanes (docétaxel)¹.

Dans notre modèle *in vitro*, la lignée tumorale mammaire humaine MDA-MB-231, le DHA (acides gras polyinsaturés de la série n-3) bloque le signal de survie ERK induit par le docétaxel et augmente son efficacité. Nous avons mis en évidence l'activation de plusieurs PKCs (alpha, epsilon et delta) lors du traitement par le docétaxel. L'utilisation d'inhibiteurs de PKCs sensibilise la lignée cellulaire MDA-MB-231 au docétaxel et inhibe l'activation de ERK induite par le docétaxel. Des expériences de fractionnement subcellulaire ont mis en évidence que : i) l'augmentation de P-ERK par le docétaxel se situe principalement au niveau membranaire et nucléaire ii) que le DHA inhibe l'activation membranaire de la PKC epsilon ainsi que la translocation nucléaire de la PKC delta induite par le docétaxel. Une stratégie d'extinction par siRNA est utilisée pour identifier l'isoforme impliquée dans l'activation du signal de résistance ERK. Des données préliminaires indiquent que la PKC delta gouverne l'activation nucléaire de ERK induite par le docétaxel. Par ailleurs, de premiers résultats montrent que le docétaxel induit la production d'acide phosphatidique membranaire à l'origine de l'activation de la voie PKC-ERK. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer si le DHA, en s'intégrant dans la membrane, bloque cette activation.

Ces résultats *in vitro* sont confortés par l'exploration d'un modèle *in vivo* de carcinogénèse mammaire chez le rongeur. En effet, les tumeurs mammaires traitées par le docétaxel présente une suractivation de la voie ERK. En revanche, les tumeurs traitées par une association docétaxel/DHA ne mettent pas en place ce mécanisme de résistance puisque la voie ERK reste inactive. Ce blocage est associé à une régression tumorale plus importante (efficacité augmentée de 50%) sans majoration des effets secondaires². Ces travaux apportent des arguments supplémentaires pour l'utilisation des acides gras polyinsaturés n-3 en tant que molécules adjuvantes pour lutter contre la résistance des tumeurs mammaires aux agents anticancéreux.

¹ McCubrey et al., 2007. Biochim. Biophys. Acta. ; ² Kornfeld et al., 2012. Carcinogenesis

Thème: Cancer du sein

Mots clés: oméga-3, taxane, résistance, ERK, PKC.

Characterization of the five cytokinin receptors in apple tree and their implications in biotic interactions

Dimitri Daudu¹, Elsa Allion¹, Nicolas Papon¹, Vincent Courdavault¹, Audrey Oudin¹, Arnaud Lanoue¹, Thomas Dugé de Bernonville¹, Emilien Foureau¹, Céline Melin¹, Sabine Carpin², Marc Clastre¹, Martine Courtois¹, Olivier Pichon¹, Marie-Noëlle Brisset^{3,4,5}, Emilie Vergne^{3,4,5}, Bruno Le Cam^{3,4,5}, David Giron⁶, Grégory Mouille^{7,8}, Stéphanie Boutet-Mercey^{7,8}, Nathalie Giglioli-Guivarc'h¹, Joël Crèche¹, Sébastien Besseau¹, Gaëlle Glévarec¹

¹EA 2106 « Biomolécules et Biotechnologies Végétales », Université François-Rabelais de Tours, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 av. Monge, F37200 Tours, France ; ²Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), BP 6759, F-45067 Orléans, France ; ³INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucouzé, France ; ⁴Université d'Angers, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France ; ⁵AgroCampus-Ouest, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France ; ⁶Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR 7261, CNRS – Université François-Rabelais de Tours, UFR Sciences et Technique, 37200 Tours, France ; ⁷INRA UMR1318 Inst. J.-P. Bourgin, Saclay Plant Sciences, 78026, Versailles Cedex, France ; ⁸AgroParisTech UMR1318 Inst. J.-P. Bourgin, Saclay Plant Sciences, 78026, Versailles Cedex, France

Cytokinins (CK) play major roles in many different developmental and physiological processes and recently their implication in plant-pathogen interactions has been established. The characterization of CK signaling is a prerequisite to understand CK role in response to biotic stress. In plants, CK signaling pathway involves a phosphotransfer cascade composed by histidine-kinase receptors (CHK), histidine phosphotransfer protein (HPT), response regulators (RR) and CK-response factors (CRF). We initiated a study of CK signaling in apple tree (*Malus x domestica*) challenged with pathogens (*Erwinia amylovora* and *Venturia inaequalis*, the causal agents of fire blight and apple scab respectively) or pest (*Phyllonorycter blancardella*, the leaf-miner insect). We first isolated five CK receptors named MdCHK2, MdCHK3a, MdCHK3b, MdCHK4a and MdCHK4b and analysed their transcript abundance in plant organs. Then, we studied their expression patterns in response to CK and the biotic stresses cited above. Finally, we evaluated the substrate specificity and sensitivity in bioassays through functional complementation in yeast. Our results highlight that each receptor presents a specific gene expression profile in apple tree organs and in response to pathogens. Each MdCHK also possesses specific sensitivity to different types of CK (including CK that could be secreted by pathogens). Taken together, our data suggest that MdCHKs could display distinct functions for the CK perception in apple tree and that physiological processes in the response to biotic stresses could be primarily propagated by MdCHK receptors.

Theme : cytokinin signalization and biotic interactions

Key words : *Malus domestica*, cytokinins, histidine kinase, histidine phosphotransfer protein, biotic interaction

Les cellules souches mésenchymateuses médullaires normales ou issues de LAM influencent l'intégrité et le cycle cellulaire des cellules leucémiques.

L. Desbourdes^{1,4}; N. Ishac^{1,4}; E. Ducrocq^{1,4}; O. Herault^{1,2,4}; E. Gyan^{1,3,4}; J. Domenech^{1,2,4}

1 Cnrs Umr 7292 Gicc, Equipe Lnox, Université François Rabelais, Tours; 2 Service Hématologie Biologique, Cnrs Umr 7292 Gicc, Equipe Lnox, Hôpital Bretonneau, Université François Rabelais, Tours; 3 Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Cnrs Umr 7292 Gicc, Equipe Lnox, Hôpital Bretonneau, Université François Rabelais, Tours ; 4 Cancéropôle Grand-Ouest, France.

La contribution des cellules souches mésenchymateuses (CSM) au processus leucémique est encore mal connue. De récentes études ont montré qu'elles présentaient des anomalies dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). L'objectif de ce travail a été de comparer *IN VITRO* les capacités de CSM issues de 6 sujets normaux et de 6 patients atteints de LAM0/1 à modifier la biologie de blastes humains de LAM. Pour ce faire, les CSM ont été co-cultivées pendant 2 à 3 jours avec la lignée KG1a (LAM0/1) et des blastes primaires autologues ou hétérologues des patients LAM. Les cellules leucémiques ont ensuite été analysées en l'absence ou présence de CSM par cytométrie en flux.

Les résultats montrent que la présence de CSM réduit l'apoptose des blastes primaires (-30%, $p = 0,002$) alors qu'aucun effet n'est observé sur les KG1a traitées à la camptothécine comparativement aux conditions sans CSM. L'analyse du cycle cellulaire a mis en évidence que le rapport G0/G1 des cellules leucémiques augmentait fortement en présence de CSM en considérant aussi bien l'ensemble des cellules (KG1a : $x2,28$ $p=0,005$; blastes primaires : $x1,51$ $p=0,117$) que la fraction adhérente aux CSM (KG1a : $x2,38$ $p=0,006$; blastes primaires : $x3,29$ $p=0,004$). De plus les blastes primaires adhérents montre aussi une légère diminution des cassures double-brin d'ADN (-10% $p=0,034$). Aucune différence significative n'a été retrouvée pour tous ces résultats dans les co-cultures avec les CSM normales et avec les CSM issues de LAM ou dans les co-cultures utilisant des CSM de LAM entre les blastes primaires autologues ou hétérologues.

Indépendamment de leur origine saine ou leucémique, les CSM protègent les blastes de l'apoptose et induisent leur quiescence, ce qui pourrait contribuer à diminuer les cassures double-brin d'ADN.

Metabolic imaging in Rat Models of the ADHD-C and ADHD-PI phenotypes

Desfosses E., Tauber C., Lepelletier FX., Chalon S., Castelnau P., Galineau L.

INSERM U930 Brain and Imaging Tours France

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterized by hyperactivity, impulsivity and inattention. It is diagnosed in 7 to 8% of the school-aged children and frequently persists through adulthood. To date, the pathophysiology of this disorder remains unclear, even if the neuropsychological theories of ADHD support the presence of alterations in executive functions and motivation in patients. Besides, the clinical neuroimaging data showed abnormalities in the fronto-striatal networks and in the dopamine and norepinephrine neurotransmission systems in ADHD patients. Three ADHD subtypes are commonly defined including patients with predominant inattention (ADHD-PI), hyperactivity/impulsivity (ADHD-HI) or all the symptoms (ADHD-C). However, this phenotypic heterogeneity is rarely taken into account by the clinical imaging studies. In this study, we aimed to better define the functional cerebral alterations underlying each symptom by using rat models of ADHD and scintigraphic imaging. It has been already demonstrated that combinations of specific strains of SHR and WKY rats can be used to model the ADHD-PI and ADHD-C phenotypes (Sagvolden et al. 2009). On the basis that brain activity is closely related to brain glucose metabolism, we performed in vivo PET using ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F FDG) on awake SHR and WKY rats. The results showed that rats with ADHD-C or ADHD-PI phenotypes displayed distinct brain metabolic profiles in the fronto-striatal regions. The two phenotypes exhibited significant bilateral increased metabolism in the nucleus accumbens in addition to decreased metabolism in the orbitofrontal cortex. However, the ADHD-C phenotype also displayed increased metabolic activities in the dorsomedial striatum, and cingulate cortex in addition to decreased metabolic activities in the prelimbic cortex. These preclinical neuroimaging data provide new findings, which could help to better understand the mechanisms of ADHD and strongly suggest the implication of functional alterations in limbic networks in the expression of the inattentive phenotype observed in such animal models.

Développement de médicaments radiopharmaceutiques fluores pour l'exploration en imagerie TEP de la neuroinflammation

.ELIE Jonathan,¹ BURON Frédéric,¹ BIDAULT Rudy,² ARLICOT Nicolas,² VERCOUILLIE Johnny,² GUILLOTEAU Denis² et ROUTIER Sylvain.¹

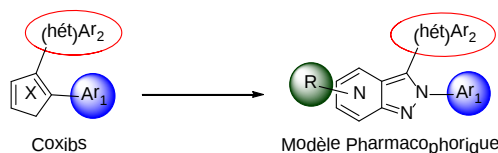
¹ Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), France.

² Université François Rabelais de Tours, UFR Sciences Pharmaceutiques, 31 Avenue Monge, 37200 Tours Centre d'Etudes et de Recherches sur les RadioPharmaceutiques (CERRP), France.

Les maladies du système nerveux central comme la sclérose en plaques, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) entraînent une réponse neuroinflammatoire qui normalement devrait avoir pour conséquence la limitation de la propagation de la maladie mais aussi la réparation et la régénération des tissus touchés. Cependant, la microglie, principale défense immunitaire du système nerveux central, passe, lors d'une maladie neurodégénérative, à un stade activé et va libérer de nombreux facteurs qui vont contribuer à la mort neuronale et de fait auto-entretenir la neuroinflammation. Parmi ces facteurs, la cyclooxygénase 2 (COX-2), enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, est fortement surexprimée lors de la neuroinflammation et devient une cible de choix pour le développement d'outils d'imagerie. Ceux-ci permettraient de diagnostiquer précocement ces pathologies et ainsi d'améliorer le pronostic vital du patient.

Le développement de nouveaux inhibiteurs radiomarqués spécifiques de COX-2 est un de nos objectifs. Parmi les nombreuses techniques d'imagerie moléculaire, la tomographie d'émission de positons (TEP) est une technique de choix pour, visualiser et quantifier la neuroinflammation, chez l'homme, permettre ainsi de comprendre les mécanismes de régulation et d'activation de la microglie. Ce projet s'intègre dans le programme INMiND (7^{ième} PCRD) qui ambitionne de développer des médicaments radiopharmaceutiques spécifiques de la cible biologique COX-2 qui puisse *in fine* être utilisable en clinique humaine.^{1,2}

A ce jour, il existe de nombreux inhibiteurs de COX-2 sur le marché (de la classe des coxibs), cependant aucun de ces composés possèdent une biodistribution spécifique au SNC, limitant leurs intérêts comme radiomarqueurs. Nous proposons donc de synthétiser de nouveaux inhibiteurs spécifiques de COX-2, basés sur des squelettes originaux de type indazoles et pyrazolopyridines substitués par des groupements, qui seront selon nous, au cœur des interactions des petites molécules avec leur cible. Les évaluations biologiques seront effectuées en collaboration avec nos partenaires et permettront d'établir les relations structure-activité, pour réorienter les futures synthèses. Les composés leaders seront sélectionnés pour le radiomarquage au ¹⁸F et leurs caractérisations pharmacologiques seront effectuées par des études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* chez l'animal.³ Ce projet, soutenu par la Région Centre s'intègre également dans les objectifs prioritaires du labex IRON.⁴



1) Hinz B., Brun K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 300, 367-375.

2) Gotlieb & al., "Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs." **2011**

3) a) Erik F.J. V. & al., *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 1700-1706, b) Jaya P. & al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1802-1807.

4) Nos remerciements à Labex Iron (ANR-11-LABX-18-01), Région Centre and Cyclopharma.

Thème : Chimie Hétérocyclique et Radiochimie

Mots-clés : COX-2, Indazole, Pyridopyrimidine, TEP, Neuroinflammation,...

Le peptide humain LL-37 augmente la migration et le calcium intracellulaire dans les cellules cancéreuses par activation du canal BKCa

A. Gambade, S. Zreika, M. Gueguinou, M. Potier-Cartereau, S. Chevalier, S. Roger, C. Vandier, C. Goupille et G. Weber

Inserm UMR1069 Nutrition, Croissance et Cancer, CHU Bretonneau, Tours
Université François Rabelais, Tours

Initialement caractérisé pour ses propriétés antimicrobiennes, le peptide LL-37 est associé à notre système immunitaire inné et permet, entre autres, la cicatrisation de blessures en augmentant la mobilité cellulaire. Cependant, ce peptide est aussi retrouvé surexprimé dans plusieurs types de cancer. Il a été montré *in vivo* qu'il participe au processus métastatique de cellules tumorales mammaires (Weber *et al.*, 2009) mais son mécanisme d'action reste inconnu.

Dans un modèle de cellules tumorales mammaires, lignée MDA-MB-435s, l'application de LL-37 augmente la migration cellulaire d'environ 3 fois. La signalisation calcique étant souvent associée au processus de migration, nous avons étudié l'effet de LL-37 sur la concentration calcique intracellulaire par fluorimétrie. Nous avons pu mettre en évidence que LL-37 augmente fortement le calcium intracellulaire. Ce phénomène peut être expliqué soit par une activation directe de canaux calciques de la membrane plasmique, soit par l'activation préalable de canaux potassiques, induisant une hyperpolarisation de la membrane cellulaire et une augmentation de la force électromotrice en faveur d'une entrée de calcium. Des analyses de Patch Clamp ont montré que LL-37 induit un courant sortant sensible à l'Ibériotoxine, inhibiteur du canal potassique mécanosensible, le BKCa. Les effets de LL-37 sur l'augmentation de calcium intracellulaire et la mobilité des cellules sont fortement inhibés par l'Ibériotoxine, démontrant l'implication du canal BKCa dans l'activité du peptide.

Pour identifier les canaux responsables de l'entrée de calcium, nous avons utilisé une approche pharmacologique et d'ARN interférents. Ainsi, le canal calcique Orai1 et l'activation d'un membre de la famille des canaux TRP sont responsables de l'entrée de calcium induite par LL-37.

La forme énantiomère D du peptide LL-37 présente des activités identiques à la forme naturelle, excluant l'hypothèse d'une interaction avec un récepteur spécifique. Nous avons donc proposé que l'activité du peptide LL-37 passe par une association avec la membrane cellulaire, entraînant une modification de la structure membranaire. La localisation de LL-37 dans la membrane reste à explorer mais nos résultats pourraient contribuer à expliquer comment ce peptide participe au processus de dissémination des cellules cancéreuses.

Thème : Canaux ioniques et cancer

Mots clés : LL-37, Migration, Calcium, Canaux calciques, canal BKCa

New selective peptidyl di(chlorophenyl)-phosphonate esters* to visualize and block neutrophil proteinase 3 in human diseases**

Carla Guarino¹, Monika Legowska², Martine Cadène³, Adam Lesner², Francis Gauthier¹,
Brice Korkmaz¹

¹INSERM U-1100/EA-6305 "Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires", Tours, France;

[#]Université François Rabelais, Tours, France;

²Faculty of Chemistry, University of Gdansk, Poland;

³Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, Orléans, France.

Human proteinase 3 (PR3), a neutrophilic serine proteinase, shares many structural and functional characteristics with human neutrophil elastase (HNE). Large amounts of both proteinases are intracellularly stored in primary granules and contribute to the degradation of the extracellular matrix components in the course of infectious and inflammatory diseases, including lung diseases. Biological inhibitors of human neutrophil serine proteases preferentially inhibit HNE and to a lesser extent proteinase 3 (PR3). To achieve PR3 selectively, we constructed two single residue PR3 mutants to investigate the non-prime substrate preferences of PR3 and HNE and used these results to develop selective phosphonate inhibitors with an Ac-peptidyl^P(O-C₆H₄-4-Cl)₂ structure. The combination of a prolyl residue at P4 and an aspartyl at P2 yielded inhibitors that rapidly and selectively inactivated PR3. N-terminal biotinylation of peptidyl-phosphonates allowed us to identify active PR3 in complex biological samples including inflammatory lung secretions and in urine samples from patients with bladder cancer. We observed intracellular PR3 in permeabilized neutrophils and on the surface of activated cells. Membrane-bound PR3, however, was hardly inhibited, suggesting that it is altered in its conformation and reactivity. Such inhibitors may be used as activity-based probes to monitor, detect or control PR3 activity in a variety of inflammatory diseases.

*Patent No: 13306514.4-1453

** Guarino et al., *submitted*

Thème : Biological sciences/Biochemistry

Mots-clés : neutrophils, proteinases, inhibitors

Rôle du complexe canalaire SK3/Orai1/TRPC1 dans la migration des cellules cancéreuses coliques HCT116 : effet du Cetuximab et voie AKT/Rac

M. Guéguinou¹, T. Harnois², A. Gambade¹, A. Chantôme¹, J.P. Haelters³, P.A. Jaffrès³, G. Weber¹, P. Bougnoux¹, N. Deliot², N. Bourmeyster², B. Constantin², T. Lecomte⁴, C. Vandier¹, M. Potier-Cartreau^{1,1}

Inserm U1069 « Nutrition, Croissance et Cancer », Université de Tours. ² Equipe ERL 7368 CNRS Université de Poitiers. ³ CNRS UMR 6521-Université de Brest. ⁴ GICC– UMR 7292 Université de Tours.

Le cetuximab est un anticorps monoclonal thérapeutique anti-EGFR induisant une modulation des voies de signalisation responsables d'une réduction de la prolifération, de l'invasion cellulaire et de la néo-angiogenèse tumorale. Cependant, ils ne sont pas efficaces dans tous les cas et il est donc nécessaire d'identifier des biomarqueurs prédictifs de l'effet anti-tumoral de ce biomédicament associé à son efficacité afin d'optimiser son utilisation. La régulation et l'activation de canaux potassiques, qui participent aux phénomènes de migration et de prolifération cellulaire, sont en partie liées à l'activation de la voie de l'EGFR. Nous avons montré un rôle du canal potassique SK3 dans la migration des cellules de cancer du colon¹. Dans le cancer du sein, ce canal forme un complexe avec le canal calcique Orai1 dans les radeaux lipidiques régulant ainsi une entrée constitutive de calcium (indépendante du RE) et la migration cellulaire. Par ailleurs, le traitement par un alkyl-lipide (Ohmlin) entraîne une délocalisation associée à une perte de fonction du complexe SK3-Orai1 réduisant ainsi la migration cellulaire². Nous émettons l'hypothèse que le cetuximab pourrait moduler les complexes de canaux potassiques et calciques et expliquer en partie, les effets biologiques modulateurs du cetuximab dans le cancer colorectal. Nous venons d'identifier chez des cellules cancéreuses coliques HCT116, un nouveau complexe canalaire exprimé au sein des radeaux lipidiques et associant les canaux SK3/Orai1/TRPC1. La formation de ce complexe est indispensable à la migration cellulaire et est associée à une entrée de calcium dépendante de la vidange des stocks calciques du RE (entrée SOCE), contrairement à ce qui a été montré dans le cancer du sein. De façon surprenante, le cetuximab, tout comme l'EGF, potentialise l'entrée SOCE et la migration cellulaire, associée à l'activation de la voie AKT/Rac nécessitant la formation du complexe SK3/Orai1/TRPC1 dans les radeaux lipidiques. L'Ohmlin entraîne une délocalisation associée à une perte de fonction du complexe inhibant ainsi l'effet du cetuximab sur la voie AKT/Rac et réduisant par conséquent la migration. En conclusion, le complexe SK3/Orai1/TRPC1 serait indispensable à l'activation de voie de signalisation AKT/Rac favorisant le développement tumorale. L'activation de ce complexe pourrait être un mécanisme de résistance au cetuximab, d'autant plus que les cellules cancéreuses HCT116 présentent une mutation somatique KRAS. Le ciblage de ce complexe par l'Ohmlin pourrait être un moyen de pallier à cette résistance. L'expression tumorale de SK3/Orai1/TRPC1 pourrait être un biomarqueur prédictif de l'efficacité du cetuximab dans le traitement du cancer colorectal en termes de réponse tumorale et de survie.

Thème : Cancer, canaux ioniques, calcium

Mots clés : Cancer du colon/ SK3 / AKT/ migration /EGFR/RAC /Cetuximab

Potier M. *et al.*, Altered SK3/KCa2.3-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. BBRC, 2010. Chantôme A *et al.*, Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. Cancer Res. 2013.

Activité antifongique d'oligomères et de dérivés du *t*-resvératrol vis-à-vis de levures pathogènes opportunistes du genre *Candida*

Benjamin Houillé,¹ Nicolas Papon,¹ Leslie Boudesocque,² Sébastien Besseau,¹ Vincent Courdavault,¹ Cécile Enguehard-Gueiffier,² Guillaume Delanoue,³ Laurence Guérin,³ Marc Clastre,¹ Nathalie Giglioli-Guivarc'h,¹ Jérôme Guillard,⁴ Arnaud Lanoue¹

¹Université François-Rabelais de Tours, EA 2106 « Biomolécules et Biotechnologie Végétales », UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 av. Monge, F37200 Tours, France ; ²Université de Tours François Rabelais de Tours, UMR INRA 1282 Infectiologie et Santé Publique, Equipe Recherche et Innovation en Chimie Médicinale, UFR Sciences Pharmaceutiques, 31 av Monge, 37200 Tours, France ; ³IFV, Institut Français de la Vigne et du Vin, 13 Avenue Emile Gounin, 37400 Amboise, France ; ⁴Université de Poitiers, Equipe Synthèse Organique, Inst. Chim. Milieux & Mat. Poitiers IC2MP, UMR 7285, 4 rue M. Brunet TSA 51106 F-86073 Poitiers cedex 9, France

Le *t*-resvératrol est un composé antifongique naturel produit par les plantes en réponse à une infection par des pathogènes. De nombreuses études ont démontré ses activités pharmacologiques incluant des propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, antioxydantes et cardioprotectives. Cependant, ses propriétés antifongiques éventuelles vis à vis de levures opportunistes d'intérêt clinique du genre *Candida* ne sont pas connues. Dans ce travail, nous avons testé l'activité candidacidal du *t*-resvératrol et de ses oligomères purifiés à partir de sarments de vigne ainsi que de dérivés du *t*-resvératrol obtenus par pharmacomodulation en utilisant des étapes de méthylation et d'acétylation. De plus, la *t*- ϵ -viniférine, un dimère de *t*-resvératrol issu de sarments de vigne, a également été soumise à des étapes de méthylation et d'acétylation en conditions non sélectives. Ni les oligomères du *t*-resvératrol ni ses produits dérivés ne se sont révélés suffisamment actifs vis à vis de *Candida albicans* SC5314. Par contre les dérivés diméthoxylés du *t*-resvératrol, les 3,5 et 3,4'-dimethoxyresvératrol ont montré des activités antifongiques avec des concentrations minimales inhibitrices de 29-37 $\mu\text{g/mL}$ vis-à-vis de *C. albicans* mais également vis-à-vis de 11 espèces de *Candida* non-*albicans*. Le 3,5-dimethoxyresvératrol, appelé aussi ptérostilbène, s'est révélé capable d'inhiber la transition morphogénétique de la forme levure à la forme filamenteuse de *C. albicans* dès 14 $\mu\text{g/mL}$. Nos résultats démontrent l'activité antifongique intéressante de deux dérivés diméthoxylés du *t*-resvératrol vis-à-vis d'un large spectre d'espèces du genre *Candida*.

Mots clés : Analogues de *t*-resveratrol, stilbènes, sarments, *Candida*, antifongique

Stat5 et cellule souche leucémique : conception d'inhibiteurs chimiques et évaluation pharmacologique

Ludovic Juen,^a Gildas Prié,^a Fabrice Gouilleux,^b Christophe Marot,^a Marie-Claude Viaud-Massuard.^a

^a EA 6306 Innovation Moléculaire et Thérapeutique, Fédération GICC UMR 7292 CNRS-Université de Tours, Labex SYNORG,* Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

^b Equipe LNOx "Niche leucémique & métabolisme oxydatif" - UMR 7292 CNRS - Faculté de Médecine - Bâtiment Dutrochet - 10^{bis} bd Tonnellé - 37032 TOURS.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie de la cellule souche hématopoïétique caractérisée par la présence de l'oncogène BCR-ABL issu de la translocation chromosomique t(9,22). Ce gène conduit à l'expression de la kinase BCR-ABL qui active de multiples voies de signalisation parmi lesquelles figurent les facteurs de signalisation Stat5a et Stat5b (Signal Transducers and Activators of Transcription 5a/5b). L'Imatinib, inhibiteur de l'activité de BCR-ABL, a été identifié mais cependant, une majorité des patients subissent des récives en cas d'arrêt du traitement et environ 15% développent des résistances à l'inhibiteur. De nombreux faits expérimentaux ont souligné le rôle des protéines Stat5, en relais incontournable de l'oncogène BCR-ABL. L'inhibition de Stat5a et Stat5b contribuerait ainsi à éliminer l'impact de ces facteurs sur la survie, l'autorenouvellement des cellules souches leucémiques et la résistance potentielle de ces cellules envers des agents anti-cancéreux. Une série de molécules issues de notre chimiothèque a été testée sur Stat5 par l'équipe de Fabrice Gouilleux (équipe 2 UMR GICC 7292) et un lead chimique capable d'inhiber sa phosphorylation a été identifié. L'optimisation de la synthèse de ce lead doit permettre sa pharmacomodulation et donc la conception d'inhibiteurs ciblés de Stat5. En fonction des résultats biologiques obtenus, une étude de relation structure-activité sera entreprise.

Thème : Chimie Médicinale

Mots-clés : Leucémie, Inhibiteurs, Stat5, Chimie Hétérocyclique

Développement de nouveaux substrats fluorescents de la MMP-12 de macrophage.

Anne-Sophie Lamort¹, Rodolphe Gravier¹, Anni Laffitte², Luiz Juliano³, Marie-Louise Zani¹ et Thierry Moreau¹

1 - CEPR UMR INSERM U1100/EA 6305, Equipe 2 Mécanismes Protéolytiques dans l'Inflammation, Université de TOURS

2- INRA UMR1324, CNRS UMR6265, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Université de BOURGOGNE

3 - Escola Paulista de Medicina, Université de SAO PAULO (Brésil)

Selon l'OMS, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est actuellement la 5^e cause de morbidité mondiale. Cette maladie pulmonaire, progressive et non réversible, causée dans plus de 90% des cas par le tabagisme, entraîne des difficultés respiratoires majeures chez les patients. L'inflammation chronique des voies aériennes, caractéristique de la maladie, a pour conséquence un recrutement massif de cellules immunitaires comme les macrophages ou les neutrophiles, qui sécrètent alors *in situ* de nombreuses protéases. Celles-ci sont à l'origine de la destruction progressive des alvéoles pulmonaires menant à l'emphysème associé à la BPCO. Parmi ces protéases, les protéases à sérine du neutrophile et la MMP-12 de macrophage jouent un rôle clé dans cette maladie. De nombreuses études soulignent l'importance de la MMP-12 dans le développement de la BPCO. Par exemple, les souris dont le gène codant la MMP-12 a été invalidé, sont résistantes à l'emphysème induit par la fumée de cigarette.

L'un des objectifs de mon projet de thèse est de concevoir un substrat sélectif de la MMP-12 pour d'une part mesurer l'activité enzymatique de cette protéase dans des milieux biologiques complexes et d'autre part, pour développer des outils d'imagerie de la protéolyse, *in vivo*, induite par la MMP-12. Pour cela nous avons tout d'abord produit le domaine catalytique de la MMP-12 humaine et murine en système bactérien (*E. coli*, souche BL21(DE3)). Après purification et renaturation de l'enzyme produite en corps d'inclusion, nous avons vérifié que chacune des formes de MMP-12 était fonctionnelle, par un test d'hydrolyse de l' α 1-PI, un de ses substrats naturels.

Nous avons ensuite développé une série de substrats fluorescents de type FRET, à partir de l'analyse des sites de clivage des substrats connus de la MMP-12 humaine. Les séquences peptidiques déduites de cette analyse, auxquelles ont été ajoutés un groupement fluorescent (Abz) en N-terminal et un groupement extincteur de fluorescence (EDDnp) en C-terminal, se révèlent être de très bon substrats de la MMP-12 humaine comme l'atteste les valeurs élevées des constantes de spécificité k_{cat}/K_m . L'hydrolyse de ces substrats par la MMP-12 de souris révèle quelques différences par rapport à la MMP-12 humaine.

Les résultats présentés permettent également d'avoir une meilleure connaissance de la spécificité enzymatique de la MMP-12 comparée à celle des autres MMPs.

Mots-clés : Protéase, MMP-12, substrat fluorogénique, inflammation pulmonaire, BPCO

Optimisation de l'analyse métabolomique multimodale (RMN, GC-MS et LC-HRMS) de cultures cellulaires

Blandine Madji Hounoum *, Hélène Blasco, Charlotte Veyrat-Durebex, Binta Diémé, Cinzia Bocca, Lydie Nadal-Desbarats, Frédéric Montigny, Christian R Andres, Patrick Emond, Sylvie Mavel

INSERM U930, Université François Rabelais, CHRU, 37000 Tours, France

L'approche métabolomique dans des modèles cellulaires a émergé comme un outil prometteur avec des applications potentielles dans de nombreux domaines de la biotechnologie et de la recherche. Une étude métabolomique comprend classiquement quatre principales étapes : (i) conception expérimentale, (ii) collection et préparation des échantillons, (iii) analyse des échantillons, et (iv) traitement des données. Alors que ces étapes sont relativement standards pour la plupart des matrices biologiques, l'application de la métabolomique à l'étude des cellules implique des traitements spécifiques des échantillons. Parmi eux, la fixation «quenching», l'extraction des métabolites du milieu intracellulaire et la préparation des échantillons en vue d'une analyse métabolomique multimodale sont des étapes délicates et indispensables qui vont conditionner la faisabilité de l'analyse, la reproductibilité du profil et la fiabilité de l'interprétation biologique des données. Ainsi une optimisation des procédés de traitement des échantillons cellulaires qui ne font actuellement pas consensus est une phase clé de ce type d'études. Ce travail a pour but de mettre au point la méthodologie adéquate de préparation des échantillons cellulaires et d'optimiser les techniques d'analyses en fonction de trois techniques complémentaires : RMN, LC-HRMS et GC-MS.

Dans le but d'approfondir l'hypothèse de l'excitotoxicité médiée par le glutamate dans la physiopathologie de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la lignée cellulaire motoneuronale NSC-34 est utilisée comme modèle. Nous avons testé deux méthodes de « quenching » : avec du méthanol à -20°C, -40°C vs sans méthanol à -80°C et plusieurs méthodes d'extraction avec différentes combinaisons de solvants : Acétonitrile, Méthanol, et Dichlorométhane. Les échantillons ont été analysés par RMN 1H. A partir des conditions optimales d'extraction, nous avons optimisé les analyses en LC-HRMS et GC-MS. Pour la LC-HRMS, nous avons testé cinq gradients avec des solvants d'élution différents (Acétonitrile/Eau vs Méthanol/Eau) et trois volumes d'injection (5, 10, 20 µL). Pour la GC-MS, deux techniques de dérivation (oxymation + silylation vs silylation) ont également été testées. Afin de juger les performances des méthodes d'extraction, nous avons analysé les paramètres suivants : qualité du chromatogramme (signal/bruit), nombre de pics détectés et de métabolites identifiés.

Nous avons montré une très grande variabilité de la qualité des résultats, et ces différents essais soutiennent la nécessité d'une optimisation préalable des protocoles de préparation et d'analyse des extraits cellulaires pour des analyses métabolomiques.

Etude *in vitro* et *ex vivo* de l'intérêt de nanocapsules de polysaccharides naturels pour l'administration cutanée de molécules actives

H.T.P. Nguyen, E. Allard-Vannier, I. Eddaoudi, M. Soucé, I. Chourpa and E. Munnier

EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes

Certaines molécules actives sont inefficaces par voie locale, faute d'une pénétration suffisante dans la peau. L'encapsulation de ces molécules dans des nanocapsules pourrait améliorer leurs performances en leur permettant de traverser le *stratum corneum* et d'atteindre les cellules-cibles. Dans le cadre du projet régional NANO'derm, nous avons préparé des nanocapsules à base de polysaccharides naturels, les alginates (NCA). Ces NCA, chargées négativement et d'une taille proche de 200nm, ont montré une absence de toxicité sur des kératinocytes humains en culture (cellules HaCaT, [NPA]<1g/L). Une analyse par FACs des cellules traitées par différents inhibiteurs spécifiques a montré que l'internalisation des NCA marquées au Dil est une endocytose, qui semble majoritairement médiée par les cavéoles. La méthode FRET et l'imagerie confocale multispectrale ont été utilisées pour étudier le devenir intracellulaire des NCA. Enfin, les NCA chargée d'un principe actif, la curcumine, ont été préparées, caractérisées et testées sur la lignée de mélanome SKMEL28. Ensuite, après stabilisation dans des formes galéniques adaptées à la voie cutanée, elles ont été testées *ex vivo* sur peau d'oreille de cochon pour confirmer l'accumulation du PA dans la peau.

Mots-clés : nanocapsules, alginate, pénétration cutanée, cellules HaCaT, fluorescence

HS-5 et HS-27A DEUX LIGNÉES MÉSENCHYMATEUSES HUMAINES SONT-ELLES UN BON MODÈLE *IN-VITRO* DE LA NICHE HÉMATOPOÏÉTIQUE?

N. Ishac¹, L.Desbourdes¹, J. Bourgeais¹, F.Gouilleux¹, J. Domenech^{1,2}, O. Hérault^{1,2}, F. Rouleux-Bonnin¹

1: GICC CNRS UMR7292 équipe LNOX, Niche Leucémique et Métabolisme Oxydatif, Université de Tours, France

2: Service d'Hématologie Biologique, Hôpital de Tours, France

L'hématopoïèse se déroule dans la niche hématopoïétique au sein de laquelle les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont en contact avec les cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Cette interaction est cruciale pour la quiescence et la différenciation des CSH. De plus, cette niche forme un sanctuaire protégeant les cellules souches leucémiques (CSL) des traitements de chimiothérapie. Il est donc important de développer un modèle de niche *in-vitro* bien contrôlé pour évaluer le rôle de la niche dans la biologie des CSL et des CSH.

Nous avons choisi comme modèle deux lignées mésenchymateuses stromales humaines HS-5 et HS-27a, très peu décrites dans la littérature. Nous avons vérifié leur caractère souche par leur capacité de tripotence et leur caractère stromal par l'expression de marqueurs de surface des CSM. L'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation, de différenciation a été étudiée ainsi que la production de protéines de la matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion/récepteurs, de facteurs de la niche et du métabolisme oxydatif. Nous avons trouvé que HS-27a exprime des gènes de la niche et que HS-5 exprime des gènes de cytokines. Nous n'avons pas trouvé de différence entre HS-27a et HS-5 pour le métabolisme rédox. En outre, nous avons évalué le potentiel de HS-5 et HS-27a à soutenir l'hématopoïèse normale des progéniteurs CD34+. Nos résultats montrent que HS-27a permet le maintien des précurseurs les plus immatures. HS-5 et HS-27a représentent des compartiments différents de la niche. Le référentiel étant établi, nous avons transformé de manière stable ces 2 lignées stromales par un système d'intégration non virale médié par le transposon piggyBac afin de développer un modèle de niche *in-vitro* très bien contrôlé.

Régulation de la synthèse hépatique des cardiolipines par TNF α et IL6 et mécanismes à l'origine des altérations bioénergétiques mitochondriales hépatiques dans la cachexie cancéreuse

Peyta L.¹, Taylor W.A.², Dumas J.F.¹, Jarnouen K.³, Coulouarn C.³, Maillot F.¹, Hatch G.M.², Loyer P.³ and Servais S¹.

¹ INSERM UMR1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", F-37032 Tours, France ² Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Manitoba, Winnipeg, Canada R3E 0T6 ³ INSERM UMR 911, "Foie Métabolisme et Cancer", 35033 Rennes, France

La cachexie cancéreuse, est caractérisée par une balance énergétique négative consécutive à une réduction des apports énergétiques, un hypermétabolisme et une inflammation systémique (cytokines pro-inflammatoires produites par la tumeur et l'hôte). Nos précédents travaux ont démontré une altération du métabolisme énergétique mitochondrial hépatique chez des rats cancéreux cachectiques. Ainsi une augmentation du gaspillage énergétique mitochondrial hépatique était corrélée à une augmentation de la quantité de cardiolipines (CL). Les CL sont des phospholipides spécifiques de la membrane interne mitochondriale qui jouent un rôle central au niveau mitochondrial. Cependant les mécanismes d'action des CL sur la bioénergétique mitochondriale ainsi que la régulation de leur synthèse ne sont pas entièrement élucidés, en particulier chez les mammifères. Le but de cette étude était d'étudier l'origine de l'accumulation des CL au niveau hépatique lors de la cachexie cancéreuse ainsi que les des CL dans la bioénergétique mitochondriale hépatique. L'expression de la PGPS était fortement augmentée (+130%, $p < 0.05$) dans les foies des rats cachectiques et pourrait contribuer à l'accumulation de CL observée. De plus, *in vitro*, l'incubation d'hépatocytes en présence de TNF α ou de l'IL6 (20 ng/ml) induit une augmentation significative et spécifique de l'expression génique de la PGPS (+40%, $p < 0.05$). Ainsi, l'inflammation systémique chez les rats cachectiques pourrait participer à l'augmentation de l'expression de la PGPS dans les mitochondries hépatiques et donc contribuer à l'accumulation de CL.

D'autre part, d'importantes modifications de la bioénergétique mitochondriale ont été observées sur une lignée stable exprimant un shRNA dirigé contre la cardiolipine synthase (shCLS) contenant 30% de CL en moins que les cellules témoins. Une diminution de la consommation d'O₂ (-30%, $p < 0.05$) a été observée aux états de phosphorylation, non phosphorylation et découplé tant avec des substrats glucidiques que lipidiques. Le rapport ATP/O (rendement énergétique) est augmenté chez les shCLS (+30% $p < 0.05$) sans modification de la synthèse d'ATP. Ainsi, la diminution de la quantité de CL affecte l'ensemble de la chaîne respiratoire. Les mécanismes impliqués (ultrastructure et réseau mitochondrial, stabilité des supercomplexes) sont actuellement étudiés. Pour conclure, nos travaux soulignent l'importance de la PGPS dans le contrôle de la synthèse des CL et sont les premiers à démontrer une régulation de la synthèse des CL par des cytokines pro-inflammatoires. Nous démontrons également que la diminution de la quantité de CL augmente le rendement énergétique mitochondrial dans des hépatocytes humains.

Thème : métabolisme énergétique et cancer

Mots-clés : mitochondrie, cardiolipines, cachexie cancéreuse

Cartographie des brevets traitant des modifications dans la partie Fc des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Jérémy Pottier^{1,2}, Hervé Watier^{1,2,3}

¹Université François-Rabelais, Tours, France ²CNRS, UMR 7292, équipe « Anticorps, récepteurs Fc et réponses cliniques » ³CHRU de Tours, France

La criticité des interactions de la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) thérapeutiques avec les cellules de l'immunité a été démontrée par notre équipe, montrant une meilleure réponse chez les patients homozygotes pour l'allotype Val 158 du FcγRIIIA. Cette publication eut pour effet de réellement convaincre l'industrie pharmaceutique de développer des variants d'IgG ayant une meilleure affinité pour le FcγRIIIA ou d'autres récepteurs. De nombreuses technologies permettant de mettre en œuvre cette ingénierie ont dès lors été protégées par brevets, sans forcément être publiées dans la littérature scientifique et échappent donc au monde académique. De plus, la multiplication du nombre de variants a créé un paysage particulièrement complexe.

Notre objectif premier est donc d'inventorier et d'analyser les technologies portant sur l'ingénierie de la portion Fc des IgG, afin de mettre au point une nomenclature standardisée et universelle des variations qui permette d'identifier plus aisément les variants employés dans les nouveaux biomédicaments en développement. Nous avons donc décidé de limiter l'analyse aux variants impliquant la charnière, le CH2, ou le CH3 de l'IgG, à l'exclusion des ajouts de composés chimiques. A partir de mots clés collectés dans la littérature, nous avons interrogé la base de données brevets Orbit[®]. Une cinquantaine de requêtes nous a permis d'identifier les brevets pertinents et de les indexer dans un pool qui comprend à ce jour 692 familles de brevets. Parmi eux, une cinquantaine de brevets (couvrant la période 1988-2000) a fait l'objet d'une analyse approfondie (analyse « microscopique »), aboutissant à l'indexation de variants Fc, soit peptidiques, soit glycaniques. Plus de 400 variants sont ainsi déjà répertoriés à ce jour (dont 240 pour le dernier brevet !). Il s'est donc avéré nécessaire de travailler à la constitution d'une réelle base de données (en cours). Dans cette base, chaque variant sera décrit sur le plan moléculaire et sur le plan de ses activités pharmacologiques.

Thèse financée par le LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01.

Thème : Réalisation d'une cartographie brevets microscopique autour des modifications dans la partie Fc des anticorps thérapeutiques.

Mots-clés : Anticorps, Immunoglobuline, Fc, Récepteurs Fc, Brevets, Ingénierie Fc

Baseline tumor volume affects rituximab pharmacokinetics in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)

Mira Tout (1), Guillaume Cartron (2), Olivier Casasnovas (3), Michel Meignan (4), Gilles Paintaud (1,5), David Ternant (1,5)

1 CNRS, UMR 7292 GICC, Université François Rabelais, Tours, France

2 Department of Hematology, CHRU Montpellier, France

3 Department of Hematology, CHU Dijon, France

4 Department of Nuclear Medicine, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France

5 CHRU de Tours, Laboratory of Pharmacology-Toxicology, Tours, France

Background: Rituximab is a chimaeric monoclonal antibody targeted against CD20 B-cell antigen. It has profoundly improved the treatment of B-cell malignancies. However, the clinical response is highly variable. Part of this variability is explained by rituximab pharmacokinetic (PK) variability, higher concentrations being associated with a better clinical response. In addition, rituximab concentrations were shown to be influenced by tumor burden. The aim of the present study was to quantify the influence of tumor volume on rituximab pharmacokinetic variability in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

Methods: In this work 89 patients with DLBCL from two prospective multicenter studies were evaluated. They received 4 rituximab 375 mg/m² infusions every two weeks. Rituximab concentrations were measured before and after each rituximab infusion, with additional samples in some patients (day 5 of each cycle, and 2 to 3 weeks after the 4th cycle). Baseline metabolic tumor volume (MTV) was measured using positron emission tomography (PET). Rituximab pharmacokinetics was described using a population approach with a two-compartment model using Monolix® 4.3.2. The influence of tumor volume was tested as a covariate on PK parameters.

Results: A total of 884 blood samples were collected. The mean (interindividual standard deviation) estimated systemic clearance (CL) was 0.0148 L/h (41.7%) and central (V1) and peripheral (V2) volumes of distribution were 4.02 L (28.3%) and 6.12 L (31.7%) respectively. MTV significantly affected CL, V1 and V2: between 0.8 and 4340 cm³, CL and V1 were doubled and V2 was increased by 7 times. Rituximab elimination half-life was significantly correlated with MTV (R²=0.29, p<0.0001) and increased to nearly 60 days for an MTV value of 4000 cm³. In a subject with median MTV, V1 and V2 were doubled when body surface area varied from 1.43 to 2.3 m².

Conclusions: Increasing tumor burden was significantly associated with a decrease of rituximab exposure. This work may allow to optimize rituximab dose according to individual tumor burden

Thème : Pharmacologie clinique

Mots-clés : baseline tumor volume, diffuse large B-cell lymphoma, population pharmacokinetics, rituximab

Metabolomic approach on an *in vitro* model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: an astrocytes and motor neurons co-culture exposed to oxidative stress

Veyrat-Durebex C^{1,2}, Corcia P^{1,3}, Piver E⁴, Emond P^{1,5}, Dangoumau A¹, Vourc'h P^{1,2},
Devos D⁶,
Andres CR^{1,2}, Blasco H^{1,2}

1. UMR INSERM U930, Université François-Rabelais Tours, Equipe « Neurogénétique et neurométabolomique », 37032 Tours, France ; 2. CHRU de Tours, Laboratoire de Biochimie et de biologie moléculaire, 37044 Tours, France ; 3. CHRU de Tours, Service de Neurologie, 37044 Tours, France ; 4. INSERM U966, 37032 Tours, France ; 5. PPF, ASB, Université François Rabelais, Tours, France ; 6. EA1046 Faculté de médecine, Lille, France

Aims

Although genetic and environmental factors have been associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), pathophysiology of ALS remains unknown in the majority of cases.

In order to improve the knowledge of the pathophysiology of this disease and associated metabolic alterations, we developed a metabolomic approach on a cellular model reproducing genetic (mutation in Superoxide Dimutase 1, *SOD1* gene) and “environmental” (oxidative stress) conditions of ALS.

Methods

A co-culture model of mouse astrocytes (C8-D1A cell line) and motor neurons (NSC-34 cell line) expressing or not human *SOD1* protein wild-type or G93C mutant were exposed to oxidative stress (menadione 10 μ M). The two cell types were collected at 3 times post-stress (for 48h). Analyzes of intracellular media were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Data were analyzed using multivariate analysis (OPLS-DA).

Results

Preliminary analysis of the results showed a difference of metabolism between the two cell types leading to a separate statistical analysis of the co-cultured astrocytes and motor neurons. We also noticed an influence of genetic and time on metabolism. We observed a different metabolism in the 48h of stress between stressed and unstressed cells, with different discriminant metabolites depending on cell type and genetic conditions. Thus we showed that stressed cells no over-expressing *SOD1* have significant higher concentrations of glutamate and aspartate (astrocytes) and threonine, serine and aspartate (motor neurons). Meanwhile, stressed cells over-expressing mutant *SOD1* have significant higher concentrations of glycine (astrocytes) and fumarate and valine (motor neurons).

Discussion and conclusion

Preliminary results from this study revealed the feasibility of a metabolomic approach on a cellular model of ALS. We brought out the potential disruption of citric acid cycle and excitatory transmission under oxidative stress in ALS, which joined the assumptions already raised in this disease. These data could open perspective of functional, genomic and transcriptomic approaches focused on metabolites identified in this study and help to better understand mechanisms of the disease.

HCV Neutralization Does Not Depend On The Neonatal Fc Receptor (FcRn)

Anthony Morel¹, Christophe Passot², Christophe Arnoult², Elodie Beaumont¹, Valérie Gouilleux-Gruart², Philippe Roingeard¹, Emmanuelle Blanchard-Laumonnier¹

¹ INSERM U966 – Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des virus des Hépatites

² Anticorps, Récepteurs Fc et Réponses Cliniques (A2RC), équipe 1 de l'UMR CNRS 7292 Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC)

The neonatal Fc receptor (FcRn) is the only known receptor able to transport IgG across cell barriers. In several cell types, FcRn resides primarily in early acidic endosomal vesicles where it binds to IgG that enter the cell by pinocytosis or endocytosis and then recycles IgG back to the plasma membrane, where the neutral pH of the extracellular compartment causes IgG release from FcRn. It has been recently demonstrated that the influenza A virus neutralization could be dependent on the FcRn transport of antibodies to the endosomal compartment. In this model, the viral neutralization by monoclonal antibodies occurs intracellularly, these antibodies being able to block fusion and egress from endosomes, resulting in the transport of virions to the lysosome for degradation. Because FcRn has been found to be efficiently produced in hepatocytes and neutralizing monoclonal antibodies against the hepatitis C virus (HCV) envelope proteins have been shown to inhibit infection at a post-attachement step, we investigated whether a FcRn-dependant mechanism could also be involved in HCV neutralization. To this aim, we established a FcRn-depleted Huh7.5 cell line, using a specific shRNA targeting the expression of the FCGRT gene. No difference between the FcRn-depleted and control cells could be observed when studying the HCV neutralization by a monoclonal antibody or by human sera. As studies of acutely HCV infected patients suggest that a strong production of neutralizing antibodies contribute to control the virus during the acute phase of HCV infection, the understanding of the mechanisms leading to HCV neutralization by antibodies might be important for the design of vaccine candidates or therapeutic antibodies that would elicit a protective humoral response. Despite the presence of FcRn in hepatocytes, our study demonstrate that it has no role in HCV neutralization, unlike the situation observed for other viral models

Développement d'une stratégie d'immunisation visant à induire une réponse largement neutralisante anti-VIH-1 de type PG9/PG16 et PGT121/128.

Morgand M, Beaumont E, Moreau A, Gaillard J, Roingeard P, Braibant M, Barin F

UMR 966 Inserm & Université François Rabelais, Tours

L'induction d'anticorps capables de neutraliser la très grande diversité des isolats circulants du VIH-1 reste à l'heure actuelle un obstacle majeur au développement d'un vaccin préventif contre le VIH/SIDA. L'objectif de notre projet est de développer une stratégie permettant d'induire des anticorps largement neutralisants dirigés contre les épitopes cibles des anticorps monoclonaux humains protecteurs des séries PG9/PG16 et PGT121/128. Notre approche est basée sur la possibilité démontrée récemment au laboratoire, d'intégrer des glycoprotéines (gps) d'enveloppe entières du VIH-1 dans des particules sous-virales (Ag HBs) du virus de l'hépatite B (VHB) et de pouvoir ainsi présenter dans un contexte membranaire une forte densité de gps à la surface de particules sous-virales. Nous incorporerons au sein de particules d'Ag HBs des gps antigéniquement divergentes mais ayant en commun la capacité de présenter les épitopes reconnus par les anticorps PG9/PG16 et PGT121/128, puis nous réaliserons des immunisations séquentielles (« prime-boost ») avec les différentes particules produites afin de permettre la sélection et la différenciation de clones B d'affinité croissante pour les épitopes ciblés.

Nous espérons par cette approche originale apporter une preuve de concept de la possibilité d'induire des anticorps neutralisants de large spectre à l'aide de particules présentant une forte densité de trimères de gps d'enveloppe du VIH sélectionnées pour exposer de façon optimale un ou des épitopes conservés d'intérêt. Si une réponse de large spectre était observée, nous pourrions envisager d'aller au-delà de cette preuve de concept et évaluer le pouvoir protecteur de ces anticorps dans des modèles de primates non-humains.

Caractérisation des protéines Lmb de *Streptococcus agalactiae*

Pauline Moulin^{1,2}, Camille Cano, Laurent Mereghetti^{1,2}, Agnès Rosenau^{1,2}, Aurélia Hiron^{1,2}
¹ Université François Rabelais de Tours, UMR 1282 ISP, Bactéries et Risque Materno-Fœtal, 37200 Tours
² INRA, UMR 1282 ISP, Bactéries et Risque Materno-Fœtal, 37380 Nouzilly

Streptococcus agalactiae est une bactérie responsable d'infections invasives notamment chez les nouveau-nés. Parmi les facteurs de virulence de la bactérie, nous nous intéressons plus particulièrement à la lipoprotéine Lmb (Laminin binding). Actuellement cette protéine a été décrite comme une adhésine se liant à la laminine humaine. Par analogie de séquence cette protéine est classée dans la famille des ABC transporteurs de zinc mais son rôle dans l'utilisation du zinc reste encore à démontrer.

Une recherche *in silico* sur les génomes séquencés de *S. agalactiae* a mis en évidence la présence du complexe perméase/ ATPase des ABC transporteurs de zinc formé des protéines AdcB et AdcC respectivement ainsi que deux homologues de la protéine, Lmb2 et Lmb3 dont le(s) rôle(s) reste(nt) à déterminer. Afin d'étudier l'implication des protéines Lmb dans le métabolisme du zinc nous avons mesuré l'expression des gènes *lmb*, *lmb2* et *lmb3* en milieu chimiquement défini contenant différentes concentration de zinc. Une forte répression de ces gènes par la protéine régulatrice AdcR a été observée dans le milieu contenant au minimum 10 µM de zinc. Pour vérifier le rôle potentiel des protéines Lmb dans la fixation de zinc, la construction de simples, doubles et triple mutant pour les gènes *lmb*, *lmb2* et *lmb3* et leur complément a été réalisée. La croissance des simples et doubles mutants pour les gènes *lmb*, *lmb2* et *lmb3* n'a pas été affectée dans un milieu pauvre en zinc contrairement au triple mutant $\Delta lmb \Delta lmb2 \Delta lmb3$ où un fort retard de croissance a été observé. Ces résultats montrent que les protéines Lmb sont impliquées dans l'utilisation du zinc et qu'elles sont redondantes. Afin de savoir si la bactérie compenserait la perte d'un ou deux des gènes codant pour les protéines Lmb par la surexpression des autres restant une mesure des transcrits de ces gènes a été réalisée par PCR quantitative. Des tests de croissance en milieux biologiques (le sang, le liquide céphalo-rachidien et le liquide amniotique) dans lesquels la bactérie est retrouvée lors d'infections à *S. agalactiae* ainsi que des tests *in vivo* permettraient d'évaluer l'impact du zinc et l'implication des protéines Lmb dans la virulence de la bactérie.

La deuxième partie de cette étude consiste à étudier le rôle des protéines Lmb dans l'adhérence, la liaison des protéines Lmb2 et Lmb3 à la laminine ou à d'autres composants de la matrice extra-cellulaire n'ayant pas encore été étudié. Pour cela des tests d'adhérence des différents mutants de *S. agalactiae* ainsi que de la souche *Lactococcus lactis*, naturellement non adhérente, transformée avec les gènes *lmb*, *lmb2* ou *lmb3* sont en cours.

L'étude de la double fonction des protéines de type Lmb permettrait d'identifier de nouveaux facteurs de pathogénicité et de mieux comprendre les liens entre le métabolisme et la virulence de *S. agalactiae*.

Thème : Transport de zinc chez *Streptococcus agalactiae*

Mots-clés : *Streptococcus agalactiae*, protéines Lmb, transport de zinc, adhésine, laminine

Urine metabolomic profiling identifies time dependent effects of calcineurine inhibitors and reflects early graft function in kidney transplant patients

Kienana MUHREZ^a, Lydie NADAL-DESBARATS^b, H       BLASCO^b, Binta DIEME^b,
Jean-Michel HALIMI^a, Chantal LE GUELLEC^a

^a EA4245, TOURS - FRANCE, ^b INSERM U930, TOURS - FRANCE

Introduction: We evaluated whether urine metabolomics may be used to monitor kidney function and discover new biomarkers in renal transplantation.

Patients and methods: Morning urines samples of 38 kidney transplant patients were prospectively collected at 7 days (D7), 3 months (M3) and 12 months (M12) after transplantation. ¹H-NMR (proton nuclear magnetic resonance) was used to express the global metabolomic signature in each sample. We studied (1) the evolution of the metabolic profile over time (D7 vs M3 and M12), (2) its dependency on the type of CNi used and (3) its relationship with renal function by comparing the metabolomic profiles at D7 between patients with immediate (IGF) or delayed graft function (DGF), and at M3 and M12 between patients with good (e-DGF ≥ 60 ml/min) or poor (e-DGF < 60 ml/min) renal function. Data were analysed by multivariate orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) using the software SIMCA-P12.

Results: Twenty-five patients were treated with Tac and 13 with CsA. Good discrimination between urine samples was obtained at different times, within each CNi group. In the Tac group, lactate and glycine concentrations were significantly higher, and creatinine, hippuric acid, dihydroxyacetone, acetoacetate, and acetate concentrations significantly lower in urines of D7 as compared to those of later periods (M3 or M12). In the CsA group, discriminant metabolites were trimethylaminoxide, creatinine, dihydroxyacetone, acetoacetate, di-methylamine and citrate (more abundant at M3 or M12). At D7, a different metabolomic profile was found between patients with IGF (n=27) and DGF (n=11). On the contrary, no difference was found between patients with good or poor renal function at M3 and at M12. No relationship was found between metabolomic profiles at D7 and renal function at M3 or M12, indicating that the early profile may not help predicting later renal status.

Conclusion: Untargeted metabolomics with ¹H-NMR is a robust procedure to analyse urine content of renal transplant patients and is suitable for studying pathophysiological disturbances in kidney transplant patients over time. This approach could be an aid to the development of biomarkers for the monitoring of these patients, mainly during the early phases of transplantation.

Th      : Kidney transplantation

Mots cl       : Metabolomics, biomarkers, kidney transplantation

Développement d'un vaccin sous-unitaire innovant contre la toxoplasmose

Thi Thanh Loi NGUYEN^a, Céline DUCOURNAU^a, Didier BETBEDER^b, Isabelle DIMIER-POISSON^{a,*}

^a Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapies Anti-Infectieuses/SP 1282 Université-INRA.
email : dimier@univ-tours.fr

^b Equipe EA 4483, laboratoire de Physiologie, faculté de Médecine, Université de Lille 2

La toxoplasmose est une parasitose qui revêt un caractère de grande sévérité au cours de toxoplasmoses cérébrales (encéphalites), oculaires (choriorétinites) ou congénitales (avortements ou malformations fœtales), en médecine humaine et vétérinaire. Aucun vaccin n'est actuellement disponible; le développement d'approches vaccinales efficaces est donc une priorité de Santé Publique. L'équipe IPVBAI de l'Université de Tours en collaboration avec l'équipe Nanoparticule EA 4483 de l'Université de Lille a mis au point un candidat vaccin sous-unitaire composé des antigènes totaux du toxoplasme couplés à des nanoparticules constituées de maltodextrine et de lipides. Ce vaccin, stable et optimisé en terme d'association d'antigènes, a été administré à 3 reprises par voie nasale avec un intervalle de 2 semaines entre chaque immunisation à des souris. L'induction d'une très forte réponse immunitaire systémique humorale et cellulaire de type Th1 et Th17 *via* la sécrétion d'IFN- γ , TNF- α et IL-17 par les lymphocytes T CD4⁺ a été corrélée après un challenge infectieux oral à une survie de 100% des animaux infectés, associée à une réduction de plus de 70% de la charge parasitaire cérébrale. Ces résultats extrêmement prometteurs nous engagent à poursuivre l'étude de l'efficacité de ce vecteur nanoparticulaire comme candidat vaccin chez les animaux de rente. Des expérimentations sur moutons sont d'ores et déjà engagées. L'administration de ces nanoparticules par voie nasale pourrait ouvrir la voie à une nouvelle stratégie de vaccination humaine et animale.

Thème : Vaccination anti-parasitaire

Mots-clés : Toxoplasmose, vaccin, nanoparticules, immunisation nasale, immunoprophylaxie

CHARACTERIZATION OF THE *FRZ*-LIKE CARBOHYDRATE METABOLIC OPERON OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

K. Patron^{1,2}, P. Gilot², A. Hiron^{1,2}, E. Camiade^{1,2} and L. Mereghetti^{1,2,3}

¹ Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Bactéries et risque materno-fœtal, Tours, France

² INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Bactéries et risque materno-fœtal, Tours, France

³ CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie, Tours, France

Streptococcus agalactiae, commonly known as group B streptococcus, is a leading cause of neonatal morbidity and mortality. It is also an emergent pathogen in immunocompromised and elderly adults. Besides, it has been shown to colonize or infect several animal species, including bovines, fishes and aquatic mammals. The implication of *S. agalactiae* in a wide variety of diseases of numerous hosts underlines its capacity of adaptation to diverse environmental conditions.

The *frz* carbohydrate metabolic operon encodes a sensor system allowing *Escherichia coli* to activate some adaptation and virulence genes in response to its environment. We identified a similar operon, that we named *frz*-like, in the genome of some *S. agalactiae* strains. This operon is composed of 7 genes that encode a MtlR family transcriptional activator (*FrzR*), a PTS transport system (*PTS^{Frz}ABC*), and three enzymes that are potentially involved in the non-oxidative pentose phosphate pathway.

We then cloned the *frz*-like promoter upstream of a β -galactosidase plasmidic reporter gene and we showed that this promoter is activated in Todd Hewitt (TH) during the late stationary phase of static growth of the wild type strain A909. On the contrary, the *frz*-like promoter is not activated in the deletion mutants A909 Δ *frzR*, A909 Δ *PTS^{Frz}ABC* and A909 Δ *frz*-like cultured in the same conditions. This promoter is again activated in the deletion mutant A909 Δ *enzymes* cultured in the same condition. Thus, *FrzR* and *PTS^{Frz}ABC* are essential for the activity of the *frz*-like promoter.

We studied the regulatory characteristics of the *frz*-like operon in chemically defined medium (MCD) containing 5mM D-glucose, D-fructose, D-ribose or D-allose as a sole carbon source. The *frz*-like promoter is highly activated in MCD containing D-allose or D-ribose during the late stationary phase of static growth, but not in presence of D-glucose or D-fructose. This observation is confirmed by the analysis of the *frz*-like operon transcription level. These results suggest that the D-allose is transported by the *PTS^{Frz}ABC* and is metabolized by the enzymes of the *frz*-like operon.

We propose that D-allose and D-ribose, which may be present in blood, cerebrospinal fluid and amniotic fluid, are sensed by the *frz*-like system to allow the adaptation of particular *S. agalactiae* strain to these biological fluids.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, MLST, *frz*, carbohydrates, PTS system

A Small Non-Coding RNA in *Streptococcus agalactiae* reveals a Pleiotrophic effect on Cell Morphology, Stress, and Glucose Starvation

MA. Zorgani¹, T. Rochat³, I. Rosinski-Chupin⁴, R. Quentin²⁻¹, P. Trieu-Cuot⁴, E. Jacquet⁵, P. Glaser⁴, P. Boulloc⁶, MF. Lartigue²⁻¹

¹UMR1282, Bactéries et risques materno-foetal, Université François Rabelais/INRA, Tours-France

²Bactériologie CHU Trousseau, Tours-France

³INRA, Jouy En Josas-France ; ⁴Institut Pasteur, Paris-France

⁵Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR230-CNRS, IMAGIF Centre de recherche de Gif, Gif Sur Yvette-France

⁶Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris Sud, Orsay-France

Background: Gene regulation is a fundamental key for bacteria to facilitate tight control of genetic networks in response to diverse extracellular stimuli. Regulatory pathways involving small non-coding RNAs (sRNAs) are now being elucidated in detail, and their functions are coming to light particularly in regards to bacterial physiology, adaptation and pathogenesis. Thus far, no sRNA has been characterized in the newborn opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae*, reason why their role remains elusive. Here we present the first study which describe the identification and the characterization of a sRNA, and we highlight his pleiotrophic effects on stress, glucose starvation-inducible operons and cell morphology.

Methods and results: First, RNA-seq was performed on *S. agalactiae* strain NEM316 isolated from a case of a fatal septicemia, and a 680bp sRNA (*srn073*) was identified in the intergenic region between *rpsF* (*gbs1759*) and *mutY* (*gbs1760*). Northern blot analysis shows that *srn073* is mainly expressed on the onset of the stationary-growth phase, and its expression is maintained even in the late stationary phase. Furthermore, following transcriptional analysis of overexpression of *srn073*, using microarray approach, five operons were identified as potential targets. These targets were confirmed by RT-qPCR when *srn073* was missing or overexpressed. Three of five operons were predicted to be involved in stress resistance, glucose starvation or cell morphology. The experimental evidence on the role of *srn073* was investigated by the construction of its deletion mutant. Microscopic observation shows that *srn073* mutant forms significantly shorter chains compared to the wild-type (WT). This phenotype was described in *Enterococcus faecalis* and linked to stress- and starvation-inducible *gls24* operon which presents 62% nucleotide identity with a previously identified target *gsb1202-gbs1207* operon on *S. agalactiae*. The expression of the later operon was upregulated in the mutant when *srn073* was overexpressed suggesting that it activate the transcription of this operon on the WT. The mutant was also more sensitive to 1 M NaCl and to glucose withdrawal.

Conclusion: This result shows that the sRNA *srn073* has a pleiotrophic effect on *S. agalactiae* through the transcriptional regulation of operon-genes expression. It is worth mentioning that *in vivo* experiments could answer more questions about the implication in *S. agalactiae* virulence and thus to be used as a possible immunotherapy target.

Thème : small RNA and gene regulation in *S. agalactiae*

Mots-clés : small RNA, *S. agalactiae*, gene regulation, trans-acting sRNA

β -Galactosidase: a function in tension wood G-layers?

A Šećerović, F Guedes, MC Lesage-Descauses, N Millet, V Lainé-Prade, F Laurans, JC Leplé, A Déjardin, G Pilate

INRA, UR588, Unité Amélioration Génétique et Physiologie Forestières, CS 40001 Ardon, 45075 Orléans Cedex 2, France.

In order to reorientate their stems and branches, Angiosperm trees produce tension wood (TW), a peculiar wood with high mechanical tensile properties. In poplar, tension wood exhibit an additional cell wall layer named G-layer, with cellulose microfibrils (CMF) nearly parallel to the cell axis and a matrix with gel-like properties. As recently reported, tensile stress generation occurs in the CMF of the G-layer, but it remains to determine by which molecular mechanism. TW immunohistolocalization evidenced RG-I type pectins in the G-layer, with an apparent loss of β -1,4 galactan side chains during G-layer differentiation.

We hypothesize that RG-I pectins were hydrolyzed by β -1,4 galactosidase leading to the formation of a gel which places microfibrils under tensile stress. Therefore, we examined the expression level of the 23 β -GAL genes present in the *Populus* genome in poplar opposite and tension wood. Only β -GAL7 was specifically expressed in tension wood. Expression level of β -GAL7 was also determined in different poplar tissues (apex, leaves, xylem, phloem, roots and seeds). To attribute a function to β -GAL7, using RNAi strategy, we produced and characterized transgenic poplars altered in β -GAL7 level.

Thème: plant physiology and molecular biology

Key words: tension wood, G-layer, cellulose microfibrils, β -Galactosidase

FORMULATION ET REPONSE CELLULAIRE DE NANOSONDES MAGNETO-PLASMONIQUES POUR L'IMAGERIE BIMODALE IRM-SERS

A. Carrouée^{1,2}, E. Allard-Vannier¹, S. Mème², JC. Beloeil², I. Chourpa¹

1 : EA6295, Nanomédicaments et Nanosondes, UFR Sciences Pharmaceutiques, Université de Tours

2 : UPR 4301 – CBM - Equipe « IRM, signaux, images et expression des gènes », Campus CNRS, Orléans

L'imagerie multimodale est une nouvelle stratégie pour améliorer le diagnostic précoce des cancers. Ce travail décrit un protocole simple et rapide permettant de formuler des nanosondes (NS) hybrides qui combinent les propriétés magnétiques et optiques à l'origine de deux techniques diagnostiques: l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la diffusion Raman exaltée de Surface ou effet SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering). L'objectif de cette stratégie est d'associer une méthode très résolutive (IRM) à une méthode très sensible et molécule-spécifique (SERS). Les nanosondes sont obtenues par un assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) et de NP d'argent plasmoniques enrichies d'un fluorochrome non toxique, le Nile Blue (NB). Pour renforcer leur stabilité, ces nanosondes sont recouvertes d'une couche de chitosan qui est biocompatible et biodégradable. L'assemblage des NS dans le PBS est totalement maîtrisé ($d_H < 200\text{nm}$; $PdI < 0,3$). Leur stabilité colloïdale est confirmée jusqu'à 30 jours, ainsi que la préservation de leur signal SERS sur le plan qualitatif comme quantitatif. La réponse bimodale IRM-SERS a d'abord été démontrée à partir de gels d'agarose à 0,5% incluant des NS. Ces gels présentent un très fort signal SERS et un contraste élevé de susceptibilité magnétique (ou SWI pour Susceptibility Weighted Imaging) en IRM. Une fois en contact avec des cellules cancéreuses (lignée HeLa), les NS entrent dans les cellules et sont relativement bien tolérées (80% survie). Elles permettent la détection sensible et contrastée d'un faible nombre de cellules cancéreuses à la fois par SERS et par IRM, ce qui est un atout pour un diagnostic précoce. Ces NS représentent donc une nouvelle génération d'agents d'imagerie bimodale.

Etude du récepteur 5-HT₆ de la sérotonine comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la neurofibromatose de type 1.

Wissem Deraredj, Laetitia Cobret, Fahima Madouri, Hélène Bénédicti et Séverine Morisset.

La Neurofibromatose de type 1 est une maladie génétique humaine due à la mutation du gène NF1, suppresseur de tumeur, codant pour la neurofibromine (Nf1). Cette maladie induit l'apparition de tumeurs au niveau du système nerveux et des troubles de mémorisation et d'apprentissage. Dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour soigner la neurofibromatose de type 1 notre équipe recherche de nouveaux partenaires protéiques de Nf1.

Notre travail porte sur l'étude d'un de ces partenaires, le récepteur 5-HT₆ de la sérotonine (R5-HT₆). Dans le contexte de la neurofibromatose. L'interaction entre ce récepteur et la protéine Nf1 a été validée par co-immunoprécipitation. Les objectifs de ce travail sont d'étudier la régulation de cette interaction dans des conditions physiologiques ou physio-pathologiques et d'en comprendre les implications fonctionnelles.

Le premier objectif a été d'identifier les domaines de Nf1 qui interagissent avec le R5-HT₆. Nous avons montré par co-immunoprécipitation que les domaines GAP, SecPH et C-terminal de Nf1 interagissaient avec le R5-HT₆. Nous avons également montré que le R5-HT₆ interagissait de manière directe et constitutive avec le domaine PH et C-terminal de Nf1 en employant la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer).

Afin d'explorer le rôle fonctionnel de ces interactions, nous dosons les taux d'AMPc intracellulaire par HTRF (Homogenous Time Resolved Transfer). La surexpression du R5-HT₆ dans des cellules Hela sous exprimant Nf1 (Hela, Nf1^{-/-}), montre que la perte de Nf1 diminue l'activité du R5-HT₆ comparé aux cellules contrôles (Nf1^{+/+}). Ce résultat a été confirmé par l'étude de l'activité du R5-HT₆ exprimé de façon stable dans une lignée de cellules après transfection de siRNA dirigé contre Nf1.

Mots-clés : Pharmacologie, R-5HT₆, Neurofibromine, BRET, Interactions, AMPc, HTRF.

Étude des propriétés du moteur moléculaire du facteur Rho de *Mycobacterium tuberculosis*

D'Heygere François^{1,2}, Schwartz Annie² & Boudvillain Marc²

¹Ecole doctoral Santé, Science Biologique et Chimie du Vivant ; Université d'Orléans

²Centre de Biophysique Moléculaire, avenue de la recherche scientifique 45000 Orléans

Chez les bactéries, le facteur Rho est impliqué dans l'une des deux voies majeures de la terminaison de la transcription. Chez *Escherichia coli*, Rho (ecRho) est capable de se déplacer le long du transcrit ARN via l'hydrolyse de NTP, afin de rattraper l'ARN-polymérase et de provoquer la dissociation du complexe d'élongation de la transcription. Durant ce processus, ecRho peut aussi déplacer des obstacles placés le long du transcrit comme les structures "R-loop" (formées lors de l'invasion de la matrice ADN par le transcrit naissant).

Toutefois il n'est pas certain que ce mécanisme soit conservé à travers tout le royaume bactérien. Récemment, une étude a proposé que le facteur Rho de *Mycobacterium tuberculosis* (mtbRho) peut entraîner la dissociation du complexe d'élongation en absence d'hydrolyse de NTP et qu'il agirait par un mécanisme différent. Pour mieux comprendre ce nouveau mécanisme potentiel, nous avons étudié la capacité de mtbRho à hydrolyser les NTP, et à dérouler des duplexes ARN:ADN. Nos résultats suggèrent que mtbRho est une hélicase peu processive, mais qui dépend de l'hydrolyse de NTP. Durant ce congrès nous discuterons nos résultats en relation avec les modèles courants de fonctionnement des moteurs moléculaires et de terminaison de la transcription Rho dépendante.

Thème : ARN et hélicases

Mots-clés : ARN, hélicase, transcription, *Mycobacterium tuberculosis*

Native high resolution mass spectrometry for kinetics monitoring by relative quantification of non-covalent HU complexes.

David Ginguen  , R my Lemeur , Bertrand Castaing , Céline Landon , Karine Loth , Martine Cadène

Equipe "Spectrom trie de Masse: Structure et Interactions des Biomolécules" CBM - CNRS, Rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 2 - France 45071 ORLEANS Cedex 2 -- France

The histone-like HU protein is required in various cellular processes such as the synchrony of the replication initiation of bacterial DNA, in DNA protection against gamma and UV radiation, and in DNA transcription. Vis et al. (1) have previously shown by mass spectrometry a possible association of HU monomers from two different species, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*, following the heat-induced dissociation of the corresponding homodimers. In *Escherichia coli*, the genes hupA and hupB encode the HU  and HU  protein chains which are only detected in stable form as hetero or homodimers: HU  , HU 2 et HU 2. Disruption of the two homologs is associated with the perturbation of cell division, a heat-lethal phenotype and a hypersensitivity to ionizing radiation. Bertrand Castaing's team has shown by microcalorimetry and circular dichroism the existence of an intermediate dimer in *E. coli* (2). The present project proposes to combine NMR spectroscopy and mass spectrometry in order to elucidate the mechanistic of dimer exchange. To visualize the exchange of protein chains between a 14N and a 15N labeled wild type homodimer we used high resolution Q-TOF mass spectrometry in non-denaturing conditions. A Maxis UHR-QTOF (Bruker) was used to obtain a relative quantification of non-covalent complexes which participate in the protein chains exchange.

Results show the formation of a hemi-labeled non-covalent protein dimer which increases over time. The kinetics of the reaction can be interpreted using known kinetic laws and varies as a function of temperature. The MS-measured kinetics of exchange of the histone-like HU dimer in *E. coli* will be used in combination with NMR data to elucidate the mechanistic of dimer exchange. .

References: (1) Vis H., Dobson C.M., Robinson C.V, Protein Science (1999) 8: 1368-1370. (2) Ramstein J., Hervouet N., Coste F., Zelwer C., Castaing B: Thermodynamics and structure. J. Mol. Biol. (2003) 331: 101-121.

Thème : Analyse de complexes non-covalents

NEAR INFRARED EMITTING LANTHANIDE NANOPARTICLES AS NOVEL IMAGING AGENTS FOR POTASSIUM CHANNELS DETECTION

I. Martinić¹, E. Trivedi², A. Chantome³, C. Vandier³, V. L. Pecoraro², S. V. Eliseeva¹ and S. Petoud¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 45071 Orléans, France

²Department of Chemistry, Willard H. Dow Laboratories, University of Michigan, Michigan 48109, USA

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université François Rabelais, 37032 Tours, France

Near-infrared (NIR) luminescent lanthanides (Ln(III)) are key elements for numerous advanced materials and their corresponding applications, such as biomedical analysis and bioimaging. Since the luminescence intensity of free Ln(III) cations is strongly limited because of their low extinction coefficients, it is important to explore new approaches for controlling the photophysical properties of Ln(III) compounds. In addition, their special optical properties i.e. sharp emission bands, large energy difference between excitation and emission wavelengths and high resistance to photobleaching overcome their existing limitations. In order to obtain a sufficient number of photons per unit volume, Ln(III) ions have to be sensitized by appropriate chromophoric groups which function as “antenna”. The use of nanoparticles allows to locate a large number of antennae and Ln(III) ions within one entity in order to increase detection sensitivity. Moreover, the presence of functional groups on the surface of nanoparticles gives an opportunity to achieve selectivity through attachment of specific targeting biomolecules. Major challenges in cancer control and treatment are focused on early detection and diagnosis. Since the potassium channels play an important role in controlling physiological and pathological cell proliferation, important progresses have been achieved in their investigation. Particularly, Kv 10.1, voltage-gated potassium channels are expressed in over 70% of human tumors. In addition, due to their extracellular accessibility Kv 10.1 channels are considered as effective therapeutic targets. Currently used immunofluorescence techniques for molecular imaging of live tumor cells rely on organic fluorophores and quantum dots have significant drawbacks. We propose NIR-emitting Ln(III)-based nanoparticles as a very promising novel agents for detection and identification of potassium channels.

Theme: NIR emitting lanthanide nanoparticles

Approche bimodale pour évaluer les changements précoces de l'oxygénation intra-tumorale: imagerie photo-acoustique couplée à des mesures de pressions partielles en oxygène

Raes Florian¹, Collet Guillaume², Kieda Claudine², Lerondel Stéphanie¹, Le Pape Alain^{1,3}

¹TAAM UPS44, CIPA, CNRS, Orléans, France, Petit imagerie animale - Orléans, France

²CBM UPR 4301, CNRS, Orléans, France, Biophysique Moléculaire - Orléans, France

³INSERM U1100/EA6305 CEPR, respiratoire MALADIE - Tours, France

L'une des principales applications de l'imagerie photoacoustique (PA) est la quantification *in vivo* de la saturation de l'hémoglobine en oxygène (SO₂). C'est une modalité qui permet de cartographier la SO₂ en temps réel, en raison des différences qui existent dans l'absorption optique entre l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée. Cependant la précision des données peut être modifiée par une variété de facteurs, notamment l'intensité et la longueur d'onde de la lumière d'excitation. Le quenching de la fluorescence du ruthénium par l'oxygène est une technique bien connue pour évaluer, *in vivo*, la pression partielle en oxygène (PO₂). Cette technique permet des mesures minimalement invasives grâce à des sondes micro-fibrées. Pour contrôler la modalité PA lors de la mesure de l'oxygénation intra-tumorale, ces deux technologies ont été utilisées simultanément pour comparer la PO₂ et la SO₂ dans un modèle murin de carcinome mammaire.

Pour les expériences, le modèle 4T1 de carcinome mammaire a été implanté chez la souris. Les volumes tumoraux ont été évalués par échographie en utilisant le système VEVO LAZR (Fujifilm Visualsonics Inc). L'oxygénation tumorale a été suivie par PA ainsi qu'avec 2 sondes OL (OxyLite, Oxford Optronix) (la première insérée en intramusculaire (IM), comme une référence, tandis que la seconde a été placée dans la tumeur, au niveau du noyau déterminé comme hypoxique en PA). La comparaison des mesures de PA et OL nécessite de faire varier la teneur en oxygène du mélange gazeux administré aux souris (100%O₂, puis 5%O₂, puis 100%O₂).

Le contrôle du positionnement des sondes OL a été effectué par échographie, de sorte que les mesures PA correspondent avec l'emplacement des sondes OL. L'effet des variations du mélange de gaz administré aux souris était clairement visible, à la fois en PA et avec les sondes OL pour la localisation IM, tandis qu'aucune variation n'a été détectée dans le cœur hypoxique de la tumeur.

La PA est donc une ressource unique permettant d'évaluer l'oxygénation tumorale dans sa totalité. L'association de la PA à des mesures de PO₂ permet de valider la capacité de la technique à mettre en évidence les variations d'oxygénation tumorales. L'OL offre un appui solide à la pertinence des données PA et peut être considérée comme technique de référence pour le management qualité de la PA.

Thème : Oxygénation tumorale

Mots-clés : Imagerie Photoacoustique, Pression partielle en oxygène, oxygénation tumorale

Sondes luminescentes à base de lanthanides-dendrimères pour l'imagerie biologique de luminescence visible et proche-infrarouge

I. Nazarenko¹, A. Foucault-Collet¹, C.M. Shade², S. Eliseeva^{1*} et S. Petoud^{1,2*}

¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Rue Charles Sandron, 45071, Orléans (France)

²Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260 (Etats-Unis)

Les complexes luminescents de lanthanides émettant des photons dans les régions du visible et du proche-infrarouge sont très attractifs pour des applications en imagerie biologique optique. Les propriétés spectroscopiques de lanthanides comme les longs temps de vie de luminescence, les bandes d'émission très étroites, caractéristiques de la nature du lanthanide permettent de s'affranchir des problèmes d'autofluorescence du milieu biologique.

Afin d'obtenir un signal de luminescence intense à partir des cations lanthanide, il est nécessaire de les sensibiliser par un effet d'antenne. Nous proposons ici de nouveaux composés à base de dendrimère de type polyamido amine de génération 3, dont la structure permet d'incorporer dans ses cavités 7-8 cations lanthanides. De plus, les 32 groupes amine primaires terminaux de cette macromolécule peuvent être facilement substitués par différents types d'antennes, permettant de contrôler finement ses propriétés optiques.

Dans cette présentation nous allons montrer entre autre l'exemple d'un complexe polynucléaire de Sm^{III} basé sur un dendrimère possédant 32 antennes 2,3-naphthalimide. Nous avons montré que l'émission du Sm^{III} peut être observée dans la région du visible et du proche infrarouge en utilisant une seule longueur d'onde d'excitation. Les images des cellules vivantes incubées en présence de cette sonde luminescente ont été réalisées dans chaque région spectrale (visible et proche infrarouge) par microscopie d'épifluorescence.

Thème : Chimie

Mots-clés : sondes luminescentes, lanthanides, PAMAM dendrimère

***GALIG*, gène inducteur de la mort cellulaire dans des cellules normales et pathologiques**

Amandine SERRANO, Martine DUBOIS, Thierry NORMAND, Stéphane CHARPENTIER, Fabienne BRULE, Alain LEGRAND, Lucile MOLLET

CBM CNRS 4301 Orléans

GALIG est un gène emboîté dans celui de la Galectine-3. Son expression permet la production de 2 protéines, via 2 cadres de lecture différents. Sa surexpression induit une mort cellulaire de type apoptose. Le gène *GALIG* est notamment exprimé chez l'Homme dans les leucocytes circulants, et dans la moelle osseuse (MO).

Nous avons mis en évidence que l'expression de *GALIG* est diminuée dans la MO de pathologies sanguines de type Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM), un cancer de la MO dû à un blocage de la différenciation cellulaire. Il existe différents types de LAM, catégorisés en fonction du stade de différenciation auquel sont bloquées les cellules myéloïdes. Il apparaît que *GALIG* s'exprime différemment dans les cellules de la MO selon le types de LAM, MO saines > LAM3 > LAM2. Ces variations d'expression suggèrent une implication de *GALIG* dans la différenciation myéloïde.

C'est pourquoi, nous avons étudié l'expression de *GALIG* dans des cellules primaires humaines (monocytes de donneurs sains) ainsi que dans plusieurs lignées myéloïdes immatures que nous avons différenciées en monocytes/macrophages. La validation de ces différenciations a été réalisée grâce à des tests de phagocytose et un test d'activation de la Caspase-1. Nous avons pu observer une forte augmentation de l'expression du gène *GALIG* (x 100) au cours de la différenciation, pour les lignées étudiées. Les cellules différenciées acquièrent la capacité de phagocyter et plus de 80% de ces cellules possèdent une Caspase-1 active caractéristique des macrophages. L'expression de *GALIG* augmente fortement pour la différenciation des cellules primaires. L'expression du gène *GALIG* semble donc jouer un rôle dans les processus de différenciation de la lignée myéloïde, mais sa fonction précise reste encore à déterminer, par des études complémentaires.

Mots-clés : *GALIG*, LAM, Apoptose, Différenciation myéloïde

Innervation et vascularisation de l'os sous-chondral dans un contexte arthrosique

Cherief M., Lespessailles E., Toumi H.

EA 4708, I3MTO, CHRO - 1 rue Porte Madeleine, 45032 Orléans, France

L'arthrose est une pathologie dégénérative impliquant tous les tissus de l'articulation et plus particulièrement, le cartilage articulaire et l'os sous-chondral. Des douleurs et une gêne fonctionnelle sont les symptômes les plus courants de l'arthrose. L'OMS estime que plus de 50% de la population âgée de plus de 65 ans présente des signes radiologiques d'arthrose.

Différents facteurs peuvent être impliqués dans l'apparition de l'arthrose, des facteurs environnementaux (traumatismes ostéoarticulaires, activités sportives), des facteurs anthropométriques (âge, poids) et des facteurs génétiques (sexe, hérédité). Il a récemment été montré dans le cartilage arthrosique une augmentation du nombre de vaisseaux et des terminaisons nerveuses sensibles et sympathiques au sein du cartilage non calcifié (1). Grâce à des techniques de biologie moléculaire et d'histologie établies par notre équipe, nous étudions les caractéristiques de la vascularisation et de l'innervation sur des échantillons de dégradation structurale de grade variable de plateaux tibiaux humains.

Les résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm du Vascular Endothelial Growth Factor et de l'ARNm du Neuronal Growth Factor, en fonction du grade de sévérité de l'arthrose. Etablir un profil d'expression de gènes et de protéines caractéristiques de l'arthrose en fonction de son grade de sévérité permettrait la détection plus précoce de l'arthrose en progression mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de signalisation biologique qui sont associés à cette progression. .

(1) Suri S et al, Ann Rheum Dis 2007 ;66 :1423-1428)

Thème: Arthrose

Mots-clés: Os sous-chondral, vascularisation, innervation, ARNm

Subchondral Bone Changes Assessment using the Fractal Signature

Thomas JANVIER, Eric LESPESSAILLES, Rachid JENNANE

Univ. Orléans, Laboratoire I3MTO - EA 4708, CHR Orléans, 1 rue Porte Madeleine, 45000 Orléans

Osteoarthritis is a disease involving subchondral bone changes (Radin and Rose 1986; Kwan Tat et al. 2010). These modifications concern composition, structure, and organization of the trabeculae at the subchondral bone (Kamibayashi et al. 1995; Ding, Odgaard, and Hvid 2003). Fractal analysis of trabecular bone texture X-ray images is one of the most promising approaches. It is cheap and non-invasive. However, difficulties arise when the fractal signature methods are used to quantify bone roughness and anisotropy on individual scales (Wolski et al. 2010; Wolski, Podsiadlo, and Stachowiak 2009). The objectives of this work are to compare existing fractal signature estimators on isotropic and anisotropic synthetic fractal images and provide new approaches to better estimate the fractal signature and describe the subchondral bone texture. The new proposed estimators should enable a better estimation of the fractal signature, improving the assessment of bone microarchitecture on radiographs at different scales. The fractal signature is used to discriminate between two populations composed of healthy controls and osteoarthritic patients.

Thème : Image Processing

Mots-clés : Texture Analysis, Fractional Brownian Motion, Fractal Signature, Bone X-ray, Knee Osteoarthritis

Effect of Beta 1.3/1.6 Glucan on chondrogenic differentiation

G.Larguech¹, M.Cherief¹, H.Toumi¹, E.Lespessailles¹ and R.Daniellou²

1/ EA 4708 - Imagerie Multimodale Multiéchelle et Modélisation du Tissu Osseux et articulaire, 1 rue Porte Madeleine
- 45000 Orléans

2/ Institut de Chimie Organique et Analytique - ICOA UMR7311, Pôle de chimie, Rue de Chartres, 45100 Orléans

Osteoarthritis (OA) is the cumulative result of mechanical and biological events that induce an imbalance in cartilage metabolism. OA is a complex process that includes several changes in extracellular matrix and in chondrocytes that are the only cell type present in cartilage. β -D-glucan is a polysaccharide that has been shown to induce proliferation of chondrocytes at the surface of articular cartilage of the tibia and femur in osteoarthritic rats. Herein, the aim is to evaluate whether β -D-glucan could regulate chondrogenesis and chondrogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs).

Bone marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) originated from Wistar Rat were prepared. Cells were incubated with various concentration of 1, 3; 1, 6- β -D-glucan (10 μ g, 100 μ g and 1000 μ g) and cultured for 5, 7, 14, or 21 days. Cells proliferation and gene expression were evaluated.

Proliferative capacity of MSCs were analysed by flow cytometry and gene expression (SOX 9, COL2A1 and ACAN) were analysed by real-time PCR.

Future experiments will be required to evaluate Chondroprotective activity of β -D-glucan and identify the biological mechanisms responsible the changes occurred at the cartilage level.

Thème: Osteoarthritis and Cartilage

Mots-clés: Chondrogenic Differentiation, BMSCs, 1, 3; 1, 6- β -D-glucan

A breakthrough in the treatment of osteoarthritis: Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells

Mazor M., Coursier R., Lespessailles E., Toumi H.

EA 4708, I3MTO, CHRO - 1 rue Porte Madeleine, 45032 Orléans, France

Articular cartilage damage and degeneration is a frequent incidence in synovial joints which leads to the development of osteoarthritis. Current treatments as microfracture surgery, mosaicoplasty and autologous chondrocyte implantation are frequently used but remain unable to restore the normal cartilage function. Recently, mesenchymal stem cells (MSC) therapy has become the main focus of tissue engineering research to achieve functional replacement of articular cartilage. Preliminary studies have been shown lately the presence of these cells in preserved parts of osteoarthritic cartilage.

Our hypothesis is that damage cartilage area as well contains a sub-population of MSC could potentially regenerate cartilage under permissive conditions.

Tibial plateau was classified in different grades (0-4) based on cartilage damage status. To confirm this macroscopical grading, expression of the general cartilage degradation markers (*COLII*, *ACAN* and *MMP3*) had been measured by Q-PCR. Furthermore, to detect presence of MSC in the damage cartilage, multilineage capacity of the cells isolated from the damaged areas have been investigated. Isolated cells underwent differentiation assay into the osteocyte, adipocyte and chondrocyte cell line which has been confirmed with specific staining for the each cell line. Expression of the two main components of extracellular matrix, aggrecan (*ACAN*) and collagen II type (*COLII*) showed significant decrease in degraded areas compared to preserved parts of the cartilage. Yet, expression of *MMP3* involved in pathogenic mechanism of osteoarthritis did not confirm in our study. Nevertheless, differentiation assay have been shown that cells from degraded areas have the capacity to form adipocyte, osteocyte and chondrocyte lineage. This result support our hypothesis that these areas contain progenitor cells with mesenchymal stem cells characteristics; capacity of multilineage formation.

Thème: Cartilage engineering

Mots-clés: sclerostin antibody, exercise, bone formation

Broad profiling prediction of protein kinase inhibitors via a Kinochemometrics approach

Nicolas Bosc¹, Christophe Meyer², Pascal Bonnet¹

¹ Université d'Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

² Janssen-Cilag, Centre de Recherche Pharma, BP615 - Chaussée du Vexin, 27106 Val-de-Reuil, France

So far 518 protein kinases have been identified in the Human genome. They share 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 or diabetes. As a result, considerable efforts have been made to find or design potent and selective protein kinase inhibitors as new potential drugs.

Because the ATP binding site is highly conserved in the protein kinase family, the design of selective inhibitors remains a challenge and has negatively impacted the progression of drug candidate to late-stage clinical development. The work presented here comes within the context of a 3D proteochemometrics approach where the kinase structural similarity will be used to derive multiple chemoinformatics models able to predict the activity and selectivity of kinase inhibitors. A novel 3D descriptor based on the protein structure has been developed. It accurately describes the kinase active site by taking into account highly conserved residues along with their pairwise distances. We demonstrate here that this descriptor successfully classifies protein kinases based on their family membership or their activation state. We are currently extending this approach to the prediction of the activity of kinase inhibitors on a large panel of protein kinases using data from academic and corporate sources. This kinochemometrics approach will help researchers to better understand protein kinase-ligand interactions and to guide the design of polypharmacological compounds.

Thème : Structural Bioinformatics & Chemoinformatics

Mots-clés : Protein Kinase, inhibitor design, proteochemometrics, molecular descriptors

.

Développement de médicaments radiopharmaceutiques fluores pour l'exploration en imagerie TEP de la neuroinflammation

.ELIE Jonathan,¹ BURON Frédéric,¹ BIDAULT Rudy,² ARLICOT Nicolas,² VERCOUILLIE Johnny,² GUILLOTEAU Denis² et ROUTIER Sylvain.¹

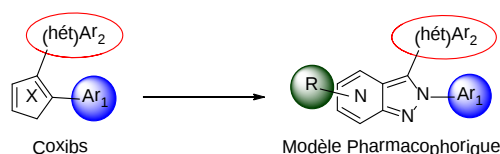
¹ Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, Rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), France.

² Université François Rabelais de Tours, UFR Sciences Pharmaceutiques, 31 Avenue Monge, 37200 Tours Centre d'Etudes et de Recherches sur les RadioPharmaceutiques (CERRP), France.

Les maladies du système nerveux central comme la sclérose en plaques, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) entraînent une réponse neuroinflammatoire qui normalement devrait avoir pour conséquence la limitation de la propagation de la maladie mais aussi la réparation et la régénération des tissus touchés. Cependant, la microglie, principale défense immunitaire du système nerveux central, passe, lors d'une maladie neurodégénérative, à un stade activé et va libérer de nombreux facteurs qui vont contribuer à la mort neuronale et de fait auto-entretenir la neuroinflammation. Parmi ces facteurs, la cyclooxygénase 2 (COX-2), enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, est fortement surexprimée lors de la neuroinflammation et devient une cible de choix pour le développement d'outils d'imagerie. Ceux-ci permettraient de diagnostiquer précocement ces pathologies et ainsi d'améliorer le pronostic vital du patient.

Le développement de nouveaux inhibiteurs radiomarqués spécifiques de COX-2 est un de nos objectifs. Parmi les nombreuses techniques d'imagerie moléculaire, la tomographie d'émission de positons (TEP) est une technique de choix pour, visualiser et quantifier la neuroinflammation, chez l'homme, permettre ainsi de comprendre les mécanismes de régulation et d'activation de la microglie. Ce projet s'intègre dans le programme INMiND (7^{ième} PCRD) qui ambitionne de développer des médicaments radiopharmaceutiques spécifiques de la cible biologique COX-2 qui puisse *in fine* être utilisable en clinique humaine.^{1,2}

A ce jour, il existe de nombreux inhibiteurs de COX-2 sur le marché (de la classe des coxibs), cependant aucun de ces composés possèdent une biodistribution spécifique au SNC, limitant leurs intérêts comme radiomarqueurs. Nous proposons donc de synthétiser de nouveaux inhibiteurs spécifiques de COX-2, basés sur des squelettes originaux de type indazoles et pyrazolopyridines substitués par des groupements, qui seront selon nous, au cœur des interactions des petites molécules avec leur cible. Les évaluations biologiques seront effectuées en collaboration avec nos partenaires et permettront d'établir les relations structure-activité, pour réorienter les futures synthèses. Les composés leaders seront sélectionnés pour le radiomarquage au ¹⁸F et leurs caractérisations pharmacologiques seront effectuées par des études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* chez l'animal.³ Ce projet, soutenu par la Région Centre s'intègre également dans les objectifs prioritaires du labex IRON.⁴



1) Hinz B., Brun K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 300, 367-375.

2) Gotlieb & al., "Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs." **2011**

3) a) Erik F.J. V. & al., *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 1700-1706, b) Jaya P. & al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1802-1807.

4) Nos remerciements à Labex Iron (ANR-11-LABX-18-01), Région Centre and Cyclopharma.

Thème : Chimie Hétérocyclique et Radiochimie

Mots-clés : COX-2, Indazole, Pyridopyrimidine, TEP, Neuroinflammation

A free accessible workflow for preprocessing virtual screening experiments

José-Manuel Gally, Nicolas Bosc, Emilie Pihan, Rohit Arora, Stéphane Bourg, Baptiste Canault, Pascal Bonnet

Structural Bioinformatics and Chemoinformatics, Université d'Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, 45067 Orléans, France

The development of new bioactive molecules is very challenging since it is constrained by multiple factors such as time and cost of drug development as well as intellectual property, which make the field of drug discovery extremely competitive. Virtual Screening is a well established *in silico* tool in drug discovery processes and can be used to identify and prioritize IP free compounds with suitable physicochemical properties.

The success of this technique relies, not only on the main *in silico* tools but also on how the ligand database has been prepared. A general protocol was therefore developed for virtual screening projects using Knime platform to ensure that the input ligands were adequate for docking by combining the benefits of several toolkits. First systematic false positives and reactive compounds are filtered. Then, structurally invalid molecules are discarded. For mixtures, only the largest compound is retained. The following step consists in computing 1D-representations of the molecules in order to detect duplicated entries so that only one tautomer and protonation state for each compound is present in the molecular database. As a compromise between exhaustiveness and computational time, molecules are protonated to physiological pH, rational tautomers and, if the chirality is not specified, stereoisomers are enumerated. Finally, three-dimensional coordinates are generated and optionally conformational states could be enumerated. Due to the nature of the packages used in this workflow, it will be freely available for academics. A forum will be set up for scientific exchange and French community-based improvement.

Marquage par ligation bio-orthogonale de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*

Aline Mongis, Friedrich Piller et Véronique Piller

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans

La glycoingénierie métabolique est une technique puissante et élégante qui permet d'introduire dans les glycanes des cellules un sucre modifié sur l'une de ses fonctions par rapport au sucre naturel correspondant. Ce processus est possible car certaines enzymes du métabolisme des sucres sont relativement permissives. Ainsi, ces sucres modifiés pénètrent facilement dans les cellules et peuvent être transformés en nucléotide-sucres. Les groupements réactifs sont ensuite introduits par glycoingénierie métabolique dans les glycanes puis exposés à la surface cellulaire. Parmi les différents analogues de sucres qui peuvent être intégrés dans le métabolisme des glycanes, les sucres azido ont été largement développés par le groupe de C. Bertozzi et sont maintenant utilisés dans de nombreux laboratoires. Le principal avantage du groupe azido découle de sa réactivité bio-orthogonale puisqu'étant naturellement absent des systèmes biologiques, il peut réagir spécifiquement avec un autre groupe également absent des systèmes biologiques. De ce fait, il est possible d'utiliser des groupes azido comme point d'ancrage pour la fixation de fluorophores ou de biotine, par exemple, dans des conditions tout à fait compatibles avec les organismes vivants.

Notre objectif est de cibler *in situ*, des immunostimulants à la surface des cellules tumorales. Ainsi, nous préparons des immunostimulants couplés avec un groupement cyclooctyne capables de se lier rapidement et spécifiquement aux sucres azido précédemment incorporés à la surface des cellules tumorales. L'association entre les immunostimulants et les cellules tumorales devrait activer le système immunitaire et de ce fait initier le rejet de la tumeur.

Thèmes : biologie cellulaire, immunologie, immunothérapie, synthèses chimiques, diagnostic

Mots-clés : cancer, glycoingénierie métabolique, ligation bio-orthogonale, immunostimulants.

Influence of iron on *in vitro* IL-1 β production induced by bacterial lipopolysaccharide

Rafiou AGORO, Catherine MURA

Molecular and Experimental Immunology and Neurogenetics UMR 7355 – CNRS – University of Orleans

Iron is essential for many metabolic activities in mammals, but also for the growth of pathogens during infections: iron homeostasis ensures the needs of the organism but also represents an innate defense mechanism against pathogens. The serum iron is controlled by hepcidin which is an antimicrobial peptide synthesized by hepatocytes and then blocked the release of iron from enterocytes and macrophages (Pietrangelo, *New Engl J. Med.* 2000). It was also shown that this peptide is also synthesized during an inflammatory response induced by lipopolysaccharide (Hentze, *Cell* 2010) showing an interaction between iron homeostasis and inflammation. In this study we investigated the production of one of the major cytokines involved in the innate immunity (IL-1 β) by RAW264.7 cells stimulated by LPS. RAW264.7 cells are mouse macrophages cells lines transformed by murine leukemia virus. Despite this viral transformation, these cells retain the macrophages properties like phagocytosis. RAW264.7 cells were cultured without or with iron (10 μ M) used as “Ferric Ammonium Citrate” (FAC) during 16 h followed by treatment with LPS (*E. coli* LPS O111: B4) at a concentration of 10ng/ml during 4 h if we performed qPCR or western blot analysis. For ELISA analysis cells were stimulated by LPS during 18h and analyses were performed on culture medium. The results showed that there is a slight decreased of IL-1 β production when cells were pre-treated by bacterial lipopolysaccharide compared to cells which are stimulated only by LPS. These results suggested that iron at a low dose with no toxic activity for cells is able to inhibit partially TLR4 pathway in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS). This finding will allow us to understand better the role of iron in the production of IL-1 β .

Keywords: Innate immunity, RAW264.7 cells, Lipopolysaccharide (LPS), Iron (ferric Ammonium Citrate), and IL-1 β .

Neuroblasts disturbances induced by perinatal exposure to glufosinate ammonium.

Ameziane HERZINE¹, Anthony LAUGERAY¹, Olivier RICHARD¹, Céline MONTECOT-DUBOURG¹, Stéphane MORTAUD¹

1: INEM-UMR7355, CNRS-Université d'Orléans.

Glufosinate-ammonium (GLA) is the active compound of worldwide-used broad spectrum herbicides. Being an analogue of glutamate, we studied its neurotoxicity during mice brain development. Previously GLA has been shown to have disturbing behavioral and cellular effects when administered acutely (at high dose) (Lapouble et al., 2002) and chronically in adult mice (at low dose) (Calas et al., 2008). In the present work, we investigated the early exposure to low doses (30 and 100 below the current NOAEL). Moreover several histological and molecular data indicated a possible impact on pathways regulating neuroblasts migration. In the rodent brain, neuroblasts originate from the subventricular zone (SVZ) and migrate along the rostral migratory stream (RMS) into the olfactory bulb where they differentiate into several classes of interneurons. Tangential migration in the RMS takes place in 'chains'. In order to provide supplementary data on the neurodevelopmental effects of GLA, we investigated the effects of perinatal exposure to low dose GLA on several parameters related to neuroblast migration. The culture of neuroblasts in Matrigel promotes cell-cell interactions, which result in a chain-like appearance. Neuroblasts from control mice migrated away from the SVZ explant and formed cell aggregations resembling chains. Each neuroblast has a long leading process; however, isolated cells were rarely seen, and nearly all neuroblasts were in contact each other. In contrast, fewer cells migrated in chain out of the exposed-mice explants, and those that did tended to be isolated.

The overall results strongly suggest that early exposure to low dose GLA during neurodevelopmental stages has deleterious effects and could be associated with behavioral alterations.

Thème : Neurotoxicologie.

Keywords: glufosinate ammonium, Pesticide, neuroblasts migration, neurodevelopment.

PKC theta controls ILC2 and Th2 responses to house dust mite allergen by inhibiting NFAT1 and IRF4

Fahima Madouri^{1,2}, Pauline Chenuet¹, Louis Fauconnier², Margaux Gallerand¹, Tiffany Marchiol², Nathalie Rouxel², Aurélie Ledru², François Erard¹, Fabrice Trovero², Valérie Quesniaux¹, Bernhard Ryffel¹ and Dieudonnée Togbe².

The molecular mechanisms underlying the initiation of adaptive allergic response are incompletely understood. Here we report that the protein serine/threonine kinase PKC- θ is involved in innate lymphoid cell 2 response in experimental house dust mite (HDM) induced allergic lung inflammation. Mice lacking PKC- θ had reduced innate lymphoid cell 2 and Th2 cell recruitment and activation with attenuated allergic asthma features. Airway hyperactivity, eosinophilic inflammation, mucus overproduction, cytokines/chemokines production were reduced in the absence of PKC- θ associated with diminished antigen presentation by DCs and expression of the transcription factors IRF4 and NFAT1. Importantly, the pharmacological PKC- θ inhibitor (compound 20) given during the challenge with HDM or birch pollen allergens significantly reduced allergic asthma including IRF4 and NFAT1 expression.

Therefore PKC- θ signaling plays a key role in ILC2 activation, antigen presentation by DCs and Th2 cell differentiation relying on IRF4 and NFAT1 in allergen-driven lung inflammation. Pharmacological blockade inhibition of established asthma suggests that PKC- θ represent a potential therapeutic target of the allergic response.

Impact d'une contrainte osmotique sur la régulation des gènes codants des RR-B dans différents organes de peuplier.

I Djeghdir¹, L. Bertheau¹, F. Chefedor¹, G. Glévarec², D. Auguin¹, F. Héricourt¹, C. Depierreux¹, D. Morabito¹, F. Brignolas¹, A. Oudin², S. Carpin¹

¹Université d'Orléans, Collegium Sciences et Techniques, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), BP 6759, 45067 Orléans cedex 02, France.

²Université François-Rabelais de Tours, EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales (BBV), 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

Les changements climatiques observés à l'échelle mondiale induisent une augmentation des périodes de sécheresse. En conséquence, les plantes doivent faire face à des diminutions de la disponibilité en eau du sol de plus en plus fréquentes. La mise en place d'une réponse adaptée face à ces contraintes est donc conditionnée par la perception et la transduction du signal de contrainte hydrique. Une des voies de signalisation impliquées dans la perception de cette contrainte est un système appelé « phosphorelais multiple » composé de trois partenaires : un récepteur Histidine-aspartate Kinase (HK), des protéines Histidine Phosphotransfert (HPT) et des Régulateurs de Réponse (RR), comprenant notamment les RR-B qui sont des facteurs de transcription.

Chez *Arabidopsis*, le récepteur AHK1 a été identifié comme impliqué dans la perception de la sécheresse, qui induit une contrainte osmotique, et interagit avec la protéine AHP2 suggérant une possible implication dans cette voie de signalisation. En ce qui concerne les RR-B, seul l'ARR18 a actuellement été identifié comme impliqué dans la réponse à la sécheresse. Chez le peuplier, un récepteur homologue d'AHK1 a été isolé, HK1, ainsi que 10 gènes codant des HPT et 11 gènes codant des RR-B. Des travaux antérieurs ont montré que 3 HPT et 5 RR-B pourraient intervenir dans une voie de signalisation osmosensing chez le peuplier.

Dans le but de confirmer l'implication de ces RR-B dans une voie osmosensing, notre premier objectif est d'étudier par RT-PCR la régulation de ces gènes dans différents organes de peuplier. Nous avons pour cela réalisé une contrainte osmotique sur une cinétique de courte et de longue durée (de 5 minutes à 6 heures). Cette étude nous permettra d'identifier les RR-B dont l'expression est régulée par la contrainte osmotique et donc potentiellement impliqués dans la voie osmosensing.

Thème : Signalisation

Mots-clés : phosphorelais multiple, osmosensing, *Populus*, Régulateurs de Réponse, facteurs de transcription

Impact d'environnements pédoclimatiques contrastés sur la méthylation de l'ADN chez le peuplier

LE GAC A.-L., LAFON-PLACETTE C., DELAUNAY A., BRIGNOLAS F. et MAURY S.

Université d'Orléans, Inra, EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, F-45067, Orléans, France.

stéphane.maury@univ-orleans.fr

Les changements climatiques globaux en cours, affectant en particulier la disponibilité en eau, pourraient impacter les rendements de la sylviculture dans l'hémisphère nord. Dans ce contexte, l'adaptation des arbres à moyen terme et à l'échelle de l'individu pourrait impliquer la plasticité phénotypique de caractères d'intérêt comme la croissance ou la tolérance à la sécheresse. Le LBLGC développe une approche intégrative afin d'identifier chez le peuplier les bases écophysiologiques et moléculaires impliquées dans la plasticité phénotypique de tels caractères d'intérêt. La méthylation de l'ADN est un processus très étudié ces dernières années et qui participe au contrôle de l'expression des gènes. Nous étudions le rôle possible de la méthylation de l'ADN dans la plasticité phénotypique de peupliers cultivés dans des environnements distincts pour leur disponibilité en eau. Nous analysons la méthylation de l'ADN au niveau génomique par la méthode de 'Methyl-DNA-ImmunoPrecipitation' (MeDIP-chip) afin d'identifier des 'Régions Différentiellement Méthylées' (RDMs) entre génotypes et/ou environnements. Dans le cadre du projet ANR SYLVABIOM, une approche focalisée sur un seul génotype de peuplier cultivé sur trois sites a permis d'identifier plus de six milles RDMs essentiellement localisées dans des gènes. L'annotation fonctionnelle et les niveaux d'expression de ces gènes seront étudiés afin de clarifier le rôle de la méthylation de l'ADN. Ces RDMs seront également comparées avec celles déjà isolées au laboratoire sur un génotype de peuplier cultivé en serre selon des modalités de disponibilité en eau variées

Characterization of the adult hypothalamic neurogenic niche in sheep and influence of an environmental factor : the photoperiod

Lucile Butruille, Martine Batailler, Martine Migaud

UMR PRC INRA - CNRS - Université de Tours - IFCE, Equipe «Microenvironnement and Dynamic of Neuroendocrine Network », NOUZILLY

In mammals, two neurogenic regions have been identified, the subventricular zone of the lateral ventricle and the subgranular cell layer of the hippocampal dentate gyrus. More recent studies have also demonstrated the presence of an adult neurogenic niche in the hypothalamus, a key region that controls physiological functions, such as reproduction. In sheep, a seasonal mammal, reproduction is characterized by the alternation of two periods: a period of reproduction during short days and a period of sexual rest during long days. In this species, seasonal changes in cell proliferation with an increase of newborn cells production during the short days have been reported in the hypothalamus (Migaud et al, 2011). In addition, the presence of neurogenic niche has also been shown in sheep hypothalamus. Moreover, DCX-positive cells were found in the vicinity of these hypothalamic neurogenic niche, indicating the presence of numerous neuroblasts in this structure (Batailler et al, 2014). Interestingly, DCX positive cells located near the third ventricle show an immature morphology whereas in the parenchyma, their morphology is reminiscent of more mature neurons, suggesting that some migratory events may occur in this structure.

This study aims at evaluating (i) whether the different components of the niche markers (neural stem cells, oligodendrocytes, microglia, etc.) are modulated by photoperiod by comparing their expression between short and long days (ii) the migratory potential of the sheep hypothalamic newly formed neurons

Spermatogénèse et allocation spermatique chez un hyménoptère parasitoïde, *Nasonia vitripennis*

Marlène Chirault¹, Lou Tranan Gohore¹, Falone Ngbondo¹, Claude Chevrier¹,
Christophe Bressac¹, Charlotte Lécureuil¹

¹ Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 7261, Université de Tours, Parc de Grandmont, F-37200 Tours,

Les hyménoptères parasitoïdes sont des insectes qui se développent au détriment d'un autre insecte hôte, ce qui leur confère un intérêt écologique et agronomique pour lutter contre les espèces envahissantes ou nuisibles. De plus, les parasitoïdes présentent plusieurs avantages permettant facilement de réaliser des études sur la fertilité fonctionnelle des mâles (faible nombre de spermatozoïdes stockés et transmis à la femelle, forte efficacité des spermatozoïdes, détermination du sexe par haplo-diploïdie facilitant le suivi du devenir des spermatozoïdes par mesure du sex-ratio de la descendance). Au sein de notre équipe, *Nasonia vitripennis*, parasitoïde de pupes de mouches, très étudié dans de nombreux domaines et dont le génome a été séquencé en 2010, a été choisi comme modèle d'étude représentatif des hyménoptères parasitoïdes. Cependant très peu de choses sont connues sur le déroulement de la spermatogénèse, et sur les stratégies de transfert des gamètes mâles chez cette espèce. Une analyse histologique a été réalisée au cours du développement chez cette espèce. Cette étude de l'appareil génital mâle, nous a permis d'observer que le testicule est composé de cystes regroupant les cellules germinales et que la spermatogénèse est synchronisée en une seule vague (à chaque stade de développement donné, un seul type de cellules germinales est retrouvé dans le testicule). La spermatogénèse se termine un jour avant l'émergence des mâles et dès le dernier stade nymphal des spermatozoïdes sont dénombrés dans les vésicules séminales. Le stock de spermatozoïdes augmente dans les vésicules séminales avec l'âge des mâles. Cependant les vésicules séminales ne sont pas les seuls organes de stockage des spermatozoïdes chez cette espèce, un stockage intermédiaire a lieu dans les testicules. Ainsi, un accouplement provoque une descente rapide des spermatozoïdes dans les vésicules séminales. Néanmoins il a pu être observé que quel que soit l'âge du mâle ou le nombre de spermatozoïdes dans les vésicules séminales, le mâle transfère lors de son premier accouplement toujours la même quantité de gamètes à la femelle. La spermatogénèse et les stratégies de transfert des spermatozoïdes ainsi décrites chez *Nasonia vitripennis* sont des éléments indispensables à connaître, afin d'analyser les conséquences de différents stress environnementaux sur la fertilité mâle chez cette espèce.

Thème : Fertilité mâle

Mots-clés : Hyménoptère parasitoïde, testicule, spermatozoïdes

Effet de la metformine sur la fonction testiculaire chez le poulet

Faure M¹, Guibert E¹, Brillard J-P², Froment P¹

1 INRA-UMR-PRC, 37380 Nouzilly, France / pfroment@tours.inra.fr

2 FERTIL'AVI, 37360 Rouziers de Touraine, France

La Metformine est une molécule qui possède des propriétés sensibilisatrices à l'insuline ainsi que des capacités anti-oxydantes, antiprolifératives, ou limitant la prise alimentaire chez les mammifères. Cette molécule agit en activant une protéine kinase appelée l'AMP-activated Protein Kinase qui intervient dans le contrôle de la balance énergétique. Nous savons également que l'influence de la nutrition est importante sur la fonction de reproduction. En effet une restriction peu de temps après l'éclosion chez le poulet retarde l'âge de la puberté et allonge la durée de la période de fertilité. Cette technique d'élevage est utilisée chez les mâles reproducteurs qui présentent une baisse de fertilité et une puberté précoce. C'est pourquoi nous avons étudié le rôle de la metformine en tant que molécule mimant la restriction alimentaire sur l'activité testiculaire du poulet à travers des expériences *in vitro*, et *in vivo*.

In vitro, le traitement à la metformine a montré une réduction des capacités de prolifération des cellules de Sertoli, sans induire plus de mort cellulaire. Après 96h de traitement, la sécrétion de lactate (substrat énergétique important pour les cellules germinales) par les cellules de Sertoli est augmentée de 4 fois. De plus une analyse en cytométrie en flux a permis de mettre en évidence que le traitement des cultures de tubes séminifères (cellules de Sertoli + cellules germinales) avec de la metformine réduit la proportion de cellules germinales dont les germinales incorporant du BrdU (en méiose et mitose).

Ces résultats ont été confirmés par des travaux réalisés *in vivo*. En effet, le poids testiculaire des poulets préalablement traités à la metformine est significativement diminué. La concentration en testostérone sanguine et testiculaire est réduite de moitié par rapport aux animaux en conditions contrôles. Bien que le stock de cellules germinales primordiales (spermatogonies) soit inchangé, la proportion de cellules germinales différenciées (spermatides) est diminuée, ce qui suggère un retard dans la spermatogenèse.

En conclusion, les résultats suggèrent que la metformine, réduit la croissance testiculaire, la prolifération des cellules de Sertoli, la production d'androgènes et retarde la première vague de spermatogenèse *in vivo*.

Les séquences répétées chez le poulet

Sébastien Guizard, Benoît Piegu, Peter Arensburger, Yves Bigot

PRC INRA Centre de Tours

Les éléments transposables (ET) sont annotés dans les génomes nouvellement séquencés avec RepeatMasker qui utilise une banque de séquences consensus d'ET. De fait, il est incapable de détecter les ETs non décrits. Chez le poulet leur quantité a été estimée à 4,31 %. Ce taux inhabituel pour un vertébré nous a conduits à réétudier leur identification, quantification et annotation en utilisant une méthode *de novo*, REPET. Celle-ci nous a aussi permis d'accéder aux séquences répétées en tandem, les microsatellites, les minisatellites et les ADN satellites. REPET a généré une bibliothèque de 867 consensus et estime la quantité d'ET à 11.5 %. Ces séquences ont été curées manuellement ce qui a permis de montrer que REPET est capable de générer les séquences d'ET connus, de découvrir nouveaux éléments génétiques mobiles. Le faible taux de couverture suggère des facteurs propres à ce type de génome ont limité l'amplification des ETs dans celui-ci au cours de son évolution. La détection des séquences satellites a été réalisée avec le programme « Tandem Repeat Finder », qui a permis d'identifier 333 et 864 types de micro- et minisatellites différents. Leur cartographie sur le génome est cours de réalisation. Ces résultats sont encourageant, mais REPET n'est pas capable d'étudier l'entièreté du génome, car il travaille sur des génomes assemblés. Le modèle de génome pour le poulet a une taille de 1,05 Gb alors que les analyses en fluorocytométrie et en cinétique de réassociation indiquent sa taille est d'environ 1,225 Gpb (soit 1,25 pg). Cette différence de 180 Mpb provient du fait que l'assemblage des séquences dans le modèle n'est pas capable de gérer celui des 100% séquences répétées, notamment celles des ADN satellites. Nos analyses seront complétée avec RepeatExplorer, un logiciel qui travaille avec les séquences brutes, et donc 100% du génome.

Thème : BioInformatique ; Mots-clés : Éléments transposables, satellite, poulet, REPET, *de novo*

Régulation de la synthèse de la mélatonine par les récepteurs à la mélatonine

Julie Lépinay, Dominique Gennetay, Didier Chesneau, Philippe Delagrance*, Catherine Taragnat et Véronique Bozon

UMR INRA - CNRS - Université de Tours -IFCE, Equipe « Neurobiologie Intégrative de la Reproduction », 37380 NOUZILLY.* Institut de Recherches Servier, 78290 Croissy-sur-Seine.

La glande pinéale est le principal lieu de synthèse de la mélatonine (MLT), neurohormone impliquée dans la reproduction des mammifères. Le facteur majeur régulant la synthèse de MLT est la durée de la nuit. La MLT se fixe sur deux récepteurs couplés aux protéines G, MT1 et MT2, avec une haute affinité et induit une stimulation des protéines Gi et une augmentation du taux de phosphorylation des Erk1/2 intracellulaires. Cogé et collaborateurs ont montré que la glande pinéale d'ovin exprimait également les ARNm codant pour les récepteurs MT. La présence du ligand et de ses récepteurs au sein du même organe suggère une régulation de la synthèse de la MLT via les récepteurs MT. L'objectif de nos travaux est donc d'étudier les propriétés fonctionnelles des récepteurs MT dans la glande pinéale ovine ainsi que leur rôle dans la synthèse de la MLT. Les cultures primaires de pinéaloctes ont été réalisées à partir de glandes pinéales d'ovins âgés de moins de 6 mois. Le taux de mélatonine a été mesuré grâce à un dosage RIA sur les surnageants de ces cultures. Les cellules ont été incubées avec des agents pharmacologiques spécifiques des récepteurs α et β adrénergiques et des récepteurs à la mélatonine (le luzindole). Lors de certaines expériences, les cellules ont été pré-incubées avec le 4-chloro-L-phenylalanine (PCPA, inhibiteur de la tryptophane hydroxylase) et la réserpine (vidangeur des vésicules à 5-HT), puis incubées avec 1 μ M d'isoprotérénol (ISO, agoniste des récepteurs adrénergiques). Par Western blot, l'activation de la voie des Map Kinases Erk 1/2 a été étudiée en stimulant les récepteurs MT avec 0,1 μ M de mélatonine +/-5 ng/ml de PTX (inhibiteur des protéines Gi) ou en présence de PCPA/réserpine. L'application de 10^{-7} M de mélatonine induit une augmentation du taux de pErk1/2 dans les pinéaloctes. Cette variation est inhibée en présence de PTX. Ces résultats suggèrent que les récepteurs MT sont exprimés dans les cellules de la culture primaire sous une forme active et sont capables de transduire un signal intracellulaire via l'activation des protéines Gi et la phosphorylation des Erk 1/2. Ces résultats sont similaires à ceux décrits dans les cellules de la pars *tuberalis* ovine. Afin d'éliminer la mélatonine endogène de nos cultures, les cellules sont soit lavées plusieurs fois avec du milieu avant stimulation, soit pré-incubées avec le PCPA/réserpine. La pré-incubation des cellules avec le PCPA induit la plus forte diminution du taux de MLT dans les surnageants de culture et inhibe la synthèse de MLT suite à l'activation des récepteurs adrénergiques par l'ISO. De plus, l'induction des pErk1/2 par la MLT exogène n'est pas modifiée. L'incubation des cellules avec 1 μ M de luzindole induit une augmentation du taux de sécrétion de la MLT ce qui suggère un rôle inhibiteur des récepteurs MT sur la synthèse de MLT dans nos cultures. Ces données suggèrent que le luzindole est soit un agoniste inverse, soit un antagoniste des récepteurs MT de la glande pinéale ovine. Dans le dernier cas, le faible taux de MLT endogène résiduel aurait une action sur les RMT. L'ensemble des résultats montrent que les récepteurs MT sont fonctionnels et sembleraient réguler négativement la synthèse de la mélatonine.

Thèmes : Neurobiologie et Voie de Signalisation

Mots clés : mélatonine, récepteur MT, glande pinéale, ovine, Erk1/2, régulation négative

Ram seminal plasma proteome and impact on sperm liquid preservation

C. Soleilhavoup¹, G. Tsikis¹, V. Labas^{1,2}, G. Harichaux^{1,2}, P. L. Kohnke¹, J.L. Dacheux¹, Y. Guérin¹, J.L. Gatti¹, S. P. de Graaf³ and X.Druart¹

1) INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

2) INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, F-37380 Nouzilly, France

3) Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney NSW 2006, Australia

Seminal plasma is composed of secretions from the epididymis and the accessory sex glands

and plays a critical role in fertilizing ability of spermatozoa. In rams, analysis of seminal plasma by GeLC MS/MS has allowed the identification of more than 700 proteins, including a high abundance of Binder of Sperm family proteins (BSP1, BSP5, SPADH1, SPADH2), the spermadhesins family (bodhesin2), lactoferrin and newly identified proteins like UPF0762 (C6orf58 gene). When spermatogenesis was stopped by scrotal insulation, changes in the proteome profile revealed the sperm origin of 40 seminal proteins, such as glycolysis pathway enzymes, the chaperonin containing TCP1 (CCT) complex and the 26S proteasome complex. Sperm mobility after liquid preservation (24h in milk at 15°C) is male dependent and can be correlated to differences in the seminal plasma proteome, detected by spectral counting. The negative association of zinc alpha-2 glycoprotein (ZAG) with semen preservation was confirmed by the use of recombinant hZAG, which induced an increase in mobility of fresh sperm, but then decreased sperm mobility after 24h of incubation. Several sperm proteins interacting with the cytoskeleton, glycolysis enzymes and sperm-associated proteins involved in capacitation correlated with better liquid storage and can be considered as seminal biomarkers of sperm preservation.

Exploiting *Catharanthus roseus* transcriptome resources to elucidate the biosynthetic pathway of monoterpene indole alkaloids.

Thomas Dugé de Bernonville¹, Marc Clastre¹, Sébastien Besseau¹, Audrey Oudin¹, Vincent Burlat^{2, 3}, Gaëlle Glévarec¹, Arnaud Lanoue¹, Nicolas Papon¹, Nathalie Giglioli-Guivarc'h¹, Benoit St-Pierre¹, Vincent Courdavault¹

1)Université François-Rabelais de Tours, EA2106 "Biomolécules et Biotechnologies Végétales", Tours, France

2)Université de Toulouse, UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales BP 42617 Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan, France

3)CNRS, UMR 5546, BP 42617 Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan, France

The biosynthetic pathway of monoterpene indole alkaloids (MIA) in *Catharanthus roseus* is near from being entirely elucidated. This specialized metabolism leads to the production of high-value compounds and follows a highly hierarchized sub-cellular and tissular compartmentation. The extensive characterization of this pathway should allow in a near future its transfer into heterologous production platform (bacteria, yeasts, plants). In order to accelerate the discovery of genes related to this biosynthetic pathway, several international consortia generated an extensive amount of data through the use of New-Generation Sequencing technologies. The objective was to characterized *C. roseus* transcriptomes in different organs and experimental conditions, offering a thus dynamic view of its genome. This approach, referred to as RNA-seq, gives information on both transcript sequence composition and abundance. Several genes have been directly identified through the analysis of those data. However, a high quality transcriptome is currently lacking. Indeed, several functionally characterized isoforms of the MIA pathway such as that of tabersonine 16-hydroxylase (T16H) are not correctly constructed in a same transcriptome assembly, rendering incomplete studies relying on gene expression levels to identify new genes. A consensus transcriptome containing all sequence and abundance information for every transcript could be useful to have more complete clustering analysis based on gene expression profiles. We therefore started to re-use publicly available datasets resulting from the high throughput sequencing of *C. roseus* cDNA libraries in order to produce such a consensus transcriptome. We used the Trinity *de novo* assembler as a basis for transcriptome reconstruction and also tested different merging combinations. Several clustering and reconstruction parameters were studied. The issue was to produce a non-redundant but complete (keeping closely related isoforms) dataset. Our analysis show that current RNA-seq characteristics, such as N50 and contig length, are not good indicators of a transcriptome quality and that a combination of filtering, abundance- and sequence-clustering steps may be necessary to clean a transcriptome assembly. A careful monitoring of each step allowed us to produce a new consensus transcriptome of high quality for *C. roseus*, which will be useful to identify new candidate genes involved in the MIA biosynthesis.

Les conférences sont classées par ordre de présentation au colloque et les posters sont classés par ordre alphabétique. **Les numéros indiqués correspondent au numéro de page** du résumé de la conférence ou du poster

Conférences

Charbonnier JB, page 5
 Bonnet P, page 6
 Herault O, page 7
 Dartier J, page 8
 Landomiel F, page 9
 Menant O, page 10
 Becard G, page 11
 Papon N, page 12
 Nys Y, page 13
 Dufour A, page 14
 Andrault PM, page 15
 Coudert E, page 16
 Foureau E, page 17
 Eghiaian F, page 18
 Cournedes PH, page 19
 Huguet E, page 20
 Pichon C, page 21
 Dore J, page 22
 Courbebaisse Y, page 23
 Maurer E, page 24
 Gosselin M, page 25
 Haran J, page 26
 Terrier V, page 27
 Etheve-Quelquejeu M, page 28
 Toumi H, page 29
 Carrouée A, page 30
 Etienne L, page 31
 Huguet K, page 32
 Adriaensen H, page 33

Posters

Agaro R, page 82
 Bon E, page 38
 Bosc N, page 78
 Bourgeais J, page 39
 Butruille L, page 87
 Carrouée A, page 66
 Chauvin L, page 40
 Cherief M, page 74
 CHirault M, page 88

 D'Heygere F, page 68
 Daudu D, page 41,
 Deraredj W, page 67
 Desbourdes L, page 42

Desfosses E, page 43
 Djeghdir I, page 85
 Dugé de Bernonville T, page 93

Elie J, page 44
 Elie J, page 79
 Faure M, page 89
 Gally JM, page 80
 Gambade A, page 45
 Guarino C, page 46
 Guéguinou M, page 47
 Guiguené D, page 69
 Guizard S, page 90

Herzine A, page 83
 Houillé B, page 48
 Ishac N, page 53
 Janvier T, page 75
 Juen L, page 49
 Lamort AS, page 50
 Laquech G, page 76
 Le Gac AL, page 86
 Lépinay J, page 91

Madji Hounoum B, page 51
 Madouri F, page 84
 Martinic I, page 70
 Mazor M, page 77
 Mongis A, page 81
 Morel A, page 58
 Morgan M, page 59
 Moulin P, page 60
 Muhrez K, page 61

Nazarenko I, page 72
 Nguyen HTP, page 52
 Nguyen T T L, page 62
 Patron K, page 63
 Peyta L, page 54
 Pottier J, page 55
 Raes F, page 71

Secrovic A, page 65
 Serrano A, page 73
 Soleilhavoup C, page 92
 Tout M, page 56
 Veyrat-Durebex C, page 57
 Zorgani M, page 64

