



*Les Biosciences
en Région
Centre Val de Loire*

ACTES
du
30^{ème} Colloque
BIOTECHNOCENTRE

12-13 Octobre 2017
Seillac (Loir et Cher)

Avec le concours du Conseil Régional



Christian ANDRES, Université de Tours, andres@med.univ-tours.fr - **Hélène BENEDETTI**, CBM-CNRS Orléans, helene.benedetti@cnrs-orleans.fr - **Catherine BEAUMONT** INRA Nouzilly, catherine.beaumont@inra.fr, **Marc BERTRAND**, Technologie Servier, marc.bertrand@fr.netgrs.com - **Franck BRIGNOLAS**, Université d'Orléans, franck.brignolas@univ-orleans.fr - **Norbert BROMET**, Biotec Centre, bromet.n@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 - **Catherine DAGORN-SCAVINER**, Région Centre, Catherine.dagorn-scaviner@regioncentre.fr - **Sophie EHRHARDT**, polepharma, sophie.ehrhardt@polepharma.com, **Francis GAUTHIER**, Université de Tours, francis.gauthier@univ-tours.fr - **Nathalie GUIVARC'H**, Université de Tours, nathalie.guivarch@univ-tours.fr - **Michel MONSIGNY**, CNRS Orléans, monsigny@cnrs-orleans.fr - **Gilles PILATE**, INRA Ardon, gilles.pilate@inra.fr - **Henri SALMON**, INRA Nouzilly, hsalmoncr@gmail.com - **Catherine TARAGNAT**, INRA Nouzilly, catherine.taragnat@inra.fr - **Marie-Claude VIAUD-MASSUARD**, Université de Tours, marie-claude.viaud-massuard@univ-tours.fr -

Présidente: **Hélène Bénédicti** helene.benedetti@cnrs-orleans.fr -

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

Chers participants, chers collègues,

Bienvenue au 30^{ème} colloque de Biotechnocentre.

Déjà 30 ans que Biotechnocentre organise ce colloque d'Automne. Cette longévité témoigne du remarquable intérêt que suscite cette manifestation parmi les acteurs de la recherche et du développement dans les domaines des Sciences de la Vie, de la Santé et du Bien-Être en Région Centre Val de Loire.

Un cocktail de plusieurs éléments permet d'expliquer cet intérêt toujours renouvelé :

Tout d'abord le colloque rassemble des acteurs régionaux de diverses origines : des chercheurs académiques, des chercheurs du privé mais aussi, depuis notre partenariat avec l'Ecole Doctorale SSBCV 549 (Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant) il y a 6 ans, de très nombreux doctorants. Tous peuvent y exposer leurs travaux ou présenter leur entreprise sous forme de conférence ou de posters

Il favorise les contacts et les échanges entre ses participants grâce au cadre convivial dans lequel il se déroule (Domaine de Seillac) et sa durée (2 jours). Cela contribue à renforcer notre identité régionale dans les domaines des Sciences du Vivant, de la Santé et du Bien-être.

Il est un reflet fidèle du tissu scientifique régional et de ses activités qui sont très diverses et qui couvrent différents domaines des sciences du vivant : biologie végétale, biologie animale, microbiologie, biologie cellulaire et moléculaire, chimie du vivant, génétique, bioinformatique, santé humaine, etc...

Il est multidisciplinaire ce qui permet à ses participants d'avoir une vision élargie favorable à l'émergence de projets originaux et innovants.

Il donne la parole à des invités extérieurs de renommée internationale qui nous font découvrir les éléments les plus novateurs de leur domaine et réciproquement, ils prennent connaissance de nos travaux qu'ils pourront divulguer hors de la Région.

Il faut ajouter qu'une telle longévité aurait été impossible sans le soutien indéfectible du Conseil Régional de la Région Centre Val de Loire qui reconnaît le rôle de ce colloque et de notre association pour favoriser les échanges public/privé, renforcer la synergie entre les technopoles d'Orléans et Tours, resserrer les liens avec l'Ecole Doctorale SSBCV 549 et valoriser l'innovation dans notre région.

Pour le 30^{ème} anniversaire du colloque, nous aurons cette année 24 conférences et 61 posters. Les conférences réuniront 5 invités extérieurs, 4 invités académiques régionaux, 1 entreprise régionale, 2 projets d'intérêt régional en fin de financement et les présentations des sujets de thèse de 12 doctorants de l'Ecole Doctorale SSBCV 549. J'espère que les conférences vous passionneront et que les présentations de posters susciteront un maximum d'échanges et de discussions.

L'anniversaire sera célébré en présence d'anciens présidents de Biotechnocentre et ce sont ses deux fondateurs, Jean-Claude Chénieux et Michel Monsigny qui remettront les prix des meilleures communications orales et meilleurs posters aux doctorants à l'issue du colloque.

Avant de vous souhaiter un excellent colloque 2017, je voulais à nouveau remercier le Conseil Régional Centre Val de Loire mais aussi l'ensemble des organismes publics et privé qui ont contribué, par leur aide financière, à la réalisation de ce 30^{ème} colloque.

Bons échanges et bon colloque !

Hélène Bénédetti
Présidente de Biotechnocentre

Conférences

1- Conformations inhabituelles des acides nucléiques

Jean-Louis MERGNY

2- Modulation de l'activité des ADN glycosylases et Applications Connexes, projet MAAC, Contrat Région Centre

Bertrand CASTAING

3- La métabolomique en 2017: comment les communautés françaises relèvent-elles les challenges technologiques ?

Dominique ROLLIN

4- L'inhibition de la SUMOylation réduit la formation des agrégats TDP43 positifs dans le cytoplasme de modèles in vitro de la SLA

Cindy MAUREL

5- Effets des acides gras polyinsaturés sur la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate

Sandy FIGIEL

6- Gap junctions dans la niche leucémique

Farah KOUZI

7- L'immunosuppression dans la DMLA : un nouvel axe thérapeutique

Bertrand CALIPPE

8- Aérosolthérapie anti-Granulocytaire pour le contrôle des pathologies Inflammatoires du Poumon, projet AGIP, Contrat Région Centre

Emilie DOZ-DEBLAUWE

9- L'implication du liquide amniotique dans la défense de l'embryon d'oiseau face aux pathogènes

Mylène DA SILVA

10- Stimulation Of P2Y11 Receptor Modulates Cardiac Fibroblasts Secretome Towards Immunomodulatory And Protective Roles After Simulated Ischemia/Reperfusion Injury

Claudie LEFORT

11- Effet immunomodulateur des protéases du neutrophile sur les cellules NK «Natural-Killer»

Alexandre VALAYER

12- Traitement peptidique des maladies autoimmunes inflammatoires

Sylviane MULLER

13- Traffic intracellulaire de la protéine GAG du VIH-1 et interaction avec ses partenaires

Hugues de ROCQUIGNY

14- Agents de contraste "intelligents" à base de Lanthanide(III) pour l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire

Célia BONNET

15- Sustainable production of innovative active ingredients for the personal care industry

Franck MICHOUX

16- Cytochromes P450 : support à la découverte du métabolisme végétal et de son évolution

Danièle WERCK

17- A promising N-terminal linker to simplify the synthesis of disulphide-rich peptides

Alba CASAS MORA

18- Les grandes algues marines : source de molécules bioactives pour le bien-être de la peau

Syntia FAYAD

19- Segmentation de l'os corticale et analyse de texture pour la prédiction des fractures ostéoporotiques

Mohamed HAFRI

20- Nouveaux modèles pour la mise en œuvre de l'évaluation pan-génomique dans le programme d'amélioration des peupliers

Marie PEGARD

21- Influence du microbiote intestinal initial sur les comportements émotionnels de la caille japonaise (*Coturnix japonica*)

Narjis KRAIMI

22- In Silico Structural Homology Modeling and Docking of Antibodies

Shifa TAHIR

23- La cytométrie de masse dans l'ère phénomique: un outil essentiel pour l'étude fonctionnelle des gènes

Hervé LUCHE

24- Biotechnologies ancestrales : utilisations récurrentes de virus par les guêpes parasites pour délivrer des molécules de virulence

Jean-Michel DREZEN

CONFERENCES

Conformations inhabituelles des acides nucléiques

Jean-Louis Mergny

Institut Européen de Chimie-Biologie – Inserm U1212 – CNRS UMR 5320 – Université de Bordeaux

Soixante ans après la découverte de la double-hélice, nous n'avons pas encore saisi la complexité structurale des acides nucléiques. Ces biopolymères ne peuvent être considérés comme de simples polymères linéaires, mais plutôt comme des architectures tri-dimensionnelles complexes. En plus de l'hélice B canonique droite, l'ADN est prédisposé à adopter une variété de structures secondaires à deux, trois ou quatre brins. Je présenterai deux de ces conformations inhabituelles :

Le motif i, est une architecture extrêmement inhabituelle, basée sur des paires de bases C.C⁺ hémiprotonnées. Cette structure est retombée dans un oubli relatif en raison de son instabilité de à pH physiologique. Cependant, nous avons très récemment montré qu'il était possible de lever cette limitation en insérant le motif i dans un édifice particulier (*article en préparation*), ce qui ouvre de nouvelles perspectives comme la conception de sonde de pH de très haute sensibilité, ou de nanostructures capables de répondre à un changement de pH. Nous venons également de démontrer la formation de ces structures dans la cellule par RMN *in vivo*, en collaboration avec le groupe de Lukas Trantirek, à Brno (*article soumis*).

Les quadruplexes de guanines sont quant à eux tout à fait compatibles avec les conditions physiologiques. Ils résultent de l'empilement de plusieurs *quartets* de guanines (reliés par des liaisons Hydrogène entre 4 guanines coplanaires) et stabilisés par des cations comme le potassium, très abondant dans la cellule. Les quadruplexes sont passés du statut de simple curiosité de laboratoire à celui de "hot topic" en une douzaine d'années. Il ne fait guère de doute que cette structure est formée au moins transitoirement *in vivo* et constitue *a minima* un problème à résoudre pour les machinerie de réplication, transcription ou réparation, mais également un élément de régulation modulant des évènements clés pour la cellule.

Thème : Acides Nucléiques

Mots clés : G-quadruplex ; i-DNA ; Auto-assemblage ; Ligands de l'ADN ; Interactions acides nucléiques – ligands.

Modulation des ADN glycosylases et Applications Connexes « MAAC2 »-Projet d'intérêt régional 2013-2017

Bertrand CASTAING¹, Philippe BERNARD², Franck COSTE¹, Charlotte RIEUX¹, Norbert GARNIER¹, Stéphane GOFFINONT¹, Loïc HABERT³, Vincent ROY³, Julien CROS¹, Zahira TBER³, Magali LORION^{2,3}, Quoc-Tuan DO², Didier GASPARUTTO⁴ & Luigi AGROFOGLIO³

1 Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), UPR4301, CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2

2 Greenpharma, 3 allée du Titane, 45100 Orléans cedex

3 Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UMR7311 CNRS-Université d'Orléans, 45100 Orléans cedex

4 CEA-Grenoble, Laboratoire des lésions de l'ADN, 38054 Grenoble cedex

Les ADN glycosylases sont des enzymes de réparation de l'ADN capables de réparer les bases oxydées de l'ADN contribuant ainsi à la stabilité de l'information génétique des organismes vivants. Dans certaines situations pathologiques, un ciblage pharmacologique impactant ces enzymes pourrait cependant ouvrir la voie à de nouvelles stratégies en thérapies anticancéreuses, anti-maladies neurodégénératives et plus généralement anti-âge. La stimulation de ces enzymes par de petites molécules pourrait aussi accroître leurs effets protecteurs de la peau vis-à-vis des radiations telles que les radiations ultraviolettes dans des applications cosmétiques, un des domaines de compétence de l'entreprise Greenpharma, partenaire industriel du projet.

L'objectif essentiel du projet MAAC2 a été de mettre en place des outils qui devraient permettre dans un avenir proche d'apporter une preuve de concept à l'hypothèse selon laquelle les ADN glycosylases sont des cibles pharmacologiques et cosmétiques pertinentes. Grâce à la synthèse de substrats fluorescents, un test de criblage moyen débit pour la recherche de modulateurs des 8-oxoG-ADN glycosylases Fpg (bactérie) et OGG1 (humain) a été mis en place au CBM et a permis d'initier une première recherche de modulateurs dans une banque de molécules naturelles fournie par Greenpharma. Sur la base de résultats préliminaires, le projet MAAC2 a aussi permis de découvrir et de mettre en évidence les caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles de petites molécules naturelles ou synthétiques se comportant comme des inhibiteurs ou activateurs des ADN glycosylases de la superfamille structurale Fpg/Nei. Ces travaux sont informatifs pour la conception future d'inhibiteurs spécifiques de la réparation des lésions radio-induites de l'ADN (des inhibiteurs de première génération sont déjà disponibles), possiblement utilisables dans de approches précliniques et nous l'espérons cliniques.

Un bilan succinct mais le plus exhaustif possible de ce projet sera présenté et l'entreprise partenaire exposera brièvement en quoi cette collaboration avec les laboratoires académiques du consortium MAAC2 a été bénéfique pour son développement.

La métabolomique en 2017 : comment les communautés françaises relèvent les défis technologiques

D. Rolin^{1*}, F. Jourdan², JC. Portais², F. Bellvert², L. Debrauwer², C. Canlet², B. Merlet², J. Bertrand-Michel¹, F. Giacomoni³, N. Paulhe³, E. Pujos-Guillot³, C. Jousse³, F. Vinson², M. Chazalviel², D. Jacob¹, L. Fouillen¹, M. Maucourt¹, A. Moing¹, S. Bernillon¹, C. Deborde¹, P. Giraudeau⁵, F. Fenaille⁴, C. Junot⁴, E. Thévenot⁴

¹ MetaboHUB Bordeaux, INRA, CNRS, Université Bordeaux, Villenave d'Ornon, France

² MetaboHUB Toulouse Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

³ MetaboHUB Clermont-Ferrand INRA Université de Clermont 1, Theix, France

⁴ MetaboHUB Paris CEA, INRA, Université Paris-Saclay, Saclay, France

⁵ CEISAM, Université de Nantes & CORSAIRE Metabolomics platform, Nantes, France

En moins de 20 ans, la métabolomique est devenue un outil de génomique fonctionnelle important et contribue à l'élucidation de questions biologiques fondamentales et à la découverte de nouveaux biomarqueurs. Des progrès considérables ont stimulé cette discipline dans l'instrumentation, l'automatisation, ainsi que dans l'analyse, la gestion et le partage des données. Aujourd'hui, la plupart des recherches sur le métabolome utilisent soit la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), soit la spectrométrie de masse (MS) couplée à la chromatographie ou à l'électrophorèse capillaire. Alors que la métabolomique atteint l'âge de sa diversité technologique, de nombreux défis subsistent. En France, la communauté scientifique de Métabolomique et Fluxomique (M & F) a construit deux structures pour relever ces défis: MetaboHUB et le RFMF. Le Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF, <http://www.rfmf.fr>) est une société scientifique française contribuant au développement de la M & F à travers diverses actions :

- Favoriser les relations entre les chercheurs francophones (secteurs public et privé);
- Promouvoir et structurer l'éducation et la formation;
- Organiser et soutenir l'organisation de conférences en France et à l'étranger;
- Encourager la participation de jeunes chercheurs à des conférences par des bourses de voyage;

MetaboHUB (<http://www.metabohub.fr>) est l'infrastructure nationale avec des partenaires affiliés dédiée à la M & F. MetaboHUB fournit des équipements et des services à la recherche universitaire et aux partenaires industriels en nutrition, santé, agriculture, environnement et biotechnologie, et développe des méthodes et des procédures pour faciliter le traitement des données et leur intégration dans les réseaux métaboliques.

Dans cette présentation, les deux plateformes en ligne Workflow4metabolomics (W4M) et MetExplore seront présentées. W4M est l'infrastructure développée en partenariat avec l'Institut Français de Bioinformatique pour le prétraitement, l'analyse statistique et l'annotation des données de métabolomiques (RMN, LC-MS et GC-MS) sous l'environnement Galaxy (<http://workflow4metabolomics.org>). MetExplore (<http://www.metexplore.fr>) est un service en ligne permettant de cartographier les données polyomiques, d'identifier et explorer les réseaux métaboliques à l'échelle du génome.

Thème : Métabolomique et traitement des données métabolomiques,

Mots clés : Métabolome, RFMF, MetaboHUB, services en ligne : W4M et MetExplore

L'inhibition de la SUMOylation réduit la formation des agrégats TDP43 positifs dans le cytoplasme de modèles *in vitro* de la SLA

Cindy Maurel¹, Anna Chami¹, Sylviane Marouillat¹, Rose-Anne Thépault¹, Céline Brulard¹, Frédéric Laumonnier¹, Hélène Blasco^{1,2}, Philippe Corcia^{1,3}, Christian R. Andres^{1,2}, Patrick Vourc'h^{1,2}

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

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la présence d'agrégats protéiques dans le cytoplasme des motoneurones en dégénérescence. Elle implique des facteurs génétiques dont les gènes *SOD1* et *TARDBP*. Notre équipe a récemment montré l'implication du mécanisme post-traductionnel de SUMOylation dans la formation des agrégats dans un modèle *in vitro* surexprimant *SOD1* mutée. Ce travail porte sur l'étude du rôle de la voie de SUMOylation dans la formation des agrégats TDP43 positifs, présents chez plus de 90% des patients SLA, qu'ils soient porteurs ou non d'une mutation du gène *TARDBP* codant TDP43.

Nous avons surexprimé les protéines GFP-TDP43 sauvage (WT) ou GFP-TDP43^{K136R}, mutée pour son unique site de SUMOylation, dans une lignée motoneuronale de souris (NSC34) et dans des motoneurones d'embryons de souris en culture. Les cellules GFP-TDP43^{WT} présentaient, comme attendu, de nombreux agrégats GFP positifs dans le cytoplasme. De manière très intéressante, nous avons observé que les cellules GFP-TDP43^{K136R} présentaient des agrégats nucléaires et non cytoplasmiques. La surexpression de la forme mutée GFP-TDP43^{K136R} était également associée à une neuritogenèse augmentée et à une réduction de toxicité par rapport à la condition TDP43^{WT}. Nous avons ensuite étudié l'effet d'une molécule inhibitrice de l'étape d'activation de la voie de la SUMOylation, l'acide anacardique, sur des cultures NSC34 reproduisant les agrégats caractéristiques de la SLA (surexpression de TDP43^{WT} ou d'un mutant SLA TDP43^{A315T}). Les premiers résultats montrent une réduction d'agrégats dans les cellules traitées avec 25 µM d'acide anacardique.

Ces résultats supportent l'idée d'un rôle de la voie de la SUMOylation dans la régulation du transport nucléo-cytoplasmique de TDP43 et dans la formation des agrégats protéiques cytoplasmiques dans la SLA. Ils font de cette voie une cible thérapeutique intéressante et de l'acide anacardique une molécule d'intérêt pour de futurs travaux dans des modèles *in vivo* de SLA.

Thème : Maladie neurodégénérative

Mots clefs : SLA, TDP43, SUMO, agrégats

Effets des acides gras polyinsaturés sur la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate

S.Figiel¹, F. Berry¹, I. Domingo¹, R. Guibon^{1,2}, C. Vandier¹, M. Potier-Cartereau¹, A. Chantôme¹, R. Félix¹, D. Fontaine¹, S. Kouba¹, Mahéo¹ et G. Fromont^{1,2}

¹Inserm U1069, Tours ; ²CHRU Bretonneau, Départements de Pathologie et d'Urologie, Tours

La progression tumorale est liée au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), pendant lequel les cellules cancéreuses perdent leurs propriétés adhésives et gagnent des propriétés migratrices et protéolytiques nécessaires à la formation de métastases. Cette TEM est induite par différents facteurs du microenvironnement (TGFB, hypoxie..) qui vont activer différents facteurs de transcription, dont Zeb1 qui augmente fortement avec les stades de progression du cancer de la prostate (CaP).

Notre précédente étude a permis de mettre en évidence que l'agressivité du CaP est corrélée négativement, chez l'homme, à certains acides gras du tissu adipeux périprostatique, l'acide linoléique (AL) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Nous avons donc ainsi analysé l'effet de ces AG, *in vitro*, sur le processus de TEM en ciblant notamment le facteur de transcription Zeb1 fortement impliqué dans la migration des cellules cancéreuses prostatiques. Nous avons pu démontrer que l'incorporation de l'AL et de l'EPA dans la membrane plasmique inhibe la migration cellulaire et l'augmentation de l'expression de Zeb1 induite par le TGFB et l'hypoxie.

De plus, étant donné l'implication du calcium dans les événements précoces de la TEM, nous nous sommes intéressés à la relation entre Zeb1 et la signalisation calcique, pouvant être directe via des canaux calciques ou indirecte via des canaux potassiques. L'utilisation de bloqueurs de ces différents canaux diminue l'expression de Zeb1. Nous avons également pu mettre en évidence un lien étroit entre Zeb1 et le canal potassique SK3. Nous déterminons actuellement l'effet de l'AL et de l'EPA sur les voies calciques induisant Zeb1 et SK3.

Thème : oncologie

Mots-clés : cancer de la prostate ; acides gras ; transition épithélio-mésenchymateuse ; canaux ioniques

Gap junctions dans la niche leucémique

F. Kouzi^{1,2}, H. Dakik¹, B. Roux^{1,3}, J. Bourgeais^{1,3}, F. Picou^{1,3}, J. Domenech^{1,3}, F. Gouilleux¹, F. Rouleux-Bonnin¹, F. Mazurier¹, K. Zibara² and O. Herault^{1,3}

1- CNRS UMR 7292, " Leukemic niche and redox metabolism " (LNOx) team, Tours, France 2- ER045, PRASE, Département de Biologie, Faculté de Sciences, université Libanaise, Beyrouth- Liban 3- CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

Le microenvironnement médullaire (niche) joue un rôle crucial dans la progression leucémique, en favorisant la quiescence des cellules leucémiques et leur chimiorésistance. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) de la niche soutiennent l'hématopoïèse leucémique avec un contact direct impliquant des jonctions gap intercellulaires, formées par différentes connexines (Cx). Leurs perturbations pourraient favoriser la leucémogénèse en perturbant l'homéostasie des niches hématopoïétiques. Notre objectif a été de rechercher s'il existe des jonctions gap spécifiques des niches leucémiques, et de préciser leur rôle dans la chimiorésistance. Nous avons étudié l'expression de 21 Cxs à la fois dans les cellules leucémiques (qRT-PCR de 23 lignées leucémiques et de 40 patients LAM ; RNA-Seq de 450 patients LAM, groupés selon leurs caractéristiques cytogénétiques et mutationnelles), et aussi dans les CSM leucémiques comparativement aux CSM de moelles normales (qRT-PCR de 19 CSM dans chaque groupe). Ces analyses ont objectivé une surexpression des Cx25, Cx31.9 et Cx59 par les cellules leucémiques, ainsi qu'une surexpression par les CSM leucémiques de Cx25, suggérant une jonction gap impliquant spécifiquement Cx25 dans la niche leucémique. Pour évaluer l'effet de l'inhibition des jonctions gap sur la chimiosensibilité des cellules leucémiques, 8 lignées cellulaires ont été exposées au carbenoxolone (un inhibiteur des Cxs) associé à la cytarabine (chimiothérapie). Les isobogrammes réalisés suggèrent un effet synergique entre ces 2 molécules et renforcent l'hypothèse d'un rôle majeur de jonctions formées par les connexines, dont spécifiquement Cx25, dans l'agressivité des leucémies, et apportent un nouvel éclairage sur des stratégies thérapeutiques originales.

Thème: Microenvironnement de la niche et rôle des jonctions gap dans l'hématopoïèse leucémique

Mots-clés : Niche leucémique, jonctions Gap, connexines, chimiosensibilité

L'immunosuppression dans la DMLA : un nouvel axe thérapeutique

Bertrand Calippe

Université François Rabelais de Tours
UMR 7292 CNRS, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer
Equipe Anticorps, Fc Récepteurs et Réponses Cliniques

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est l'une des principales causes de cécité irréversible dans les pays industrialisés et se caractérise par une perte progressive de la vision centrale. Il existe une forme néovasculaire dite « humide » et une forme d'atrophie géographique dite « sèche ». Les patients présentent une dégénérescence des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) sous-jacent, tissu indispensable à l'homéostasie locale. Plus récemment, l'accumulation de phagocytes mononucléés (MP) a été observée dans l'espace sous-rétinien, malgré le privilège immun instauré par l'EPR. Aujourd'hui il n'existe des traitements que pour la forme néovasculaire, notamment par injection d'anticorps monoclonaux qui ciblent le VEGF. Cependant une grande partie des patients sont résistants à ce type de traitement ou le deviennent et il n'existe pas de traitement pour la forme sèche. Mes travaux dans l'équipe du Dr. Sennlaub ont permis de démontrer que les MP de l'espace sous-rétinien proviennent de monocytes circulants et de microglies rétiniennes et qu'ils sont toxiques pour les photorécepteurs. A partir de modèles murins, nous avons également montré que l'APOE, dont les polymorphismes sont associés à cette pathologie, perturbe l'immunosuppression locale induite par la présentation de Fas Ligand à la surface de l'EPR.

En 2005, plusieurs groupes ont démontré qu'un polymorphisme (Y402H) du Facteur H du complément (CFH), présent dans 10% de la population, était très fortement associé aux deux formes de la DMLA. Les travaux présentés ici (Calippe *et al.* *Immunity* 2017) montrent que la déficience en CFH limite l'accumulation des MP de l'espace sous-rétinien et la dégénérescence des PR dans les modèles murins de la DMLA et d'inflammation rétinienne. Ces effets s'expliquent par la fixation du CFH sur CD11b, qui inhibe alors la fixation de la Thrombospondine-1 sur CD47. Cette protéine transmembranaire ubiquitaire, lorsqu'elle est activée, augmente les effets de la signalisation induite par la reconnaissance de Fas Ligand sur le récepteur Fas de la cellule cible. Ainsi le CFH, et encore plus la forme à risque, favorise la survie des MP dans l'espace sous-rétinien. En plus de décrire une fonction non canonique du CFH, cette étude confirme l'importance de résoudre l'inflammation rétinienne au cours d'une DMLA. De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les MP de patients atteints de DMLA peuvent donc être envisagées. Puisque les mêmes effets du CFH et de la Thrombospondine-1 sont retrouvés dans un modèle murin d'inflammation par l'induction d'une péritonite aseptique, cette stratégie est applicable dans d'autres pathologies immuno-inflammatoires.

Mots clés : Dégénérescence maculaire liée à l'âge, Facteur H du complément, Phagocytes Mononucléés, Thrombospondine-1, CD47, résolution de l'inflammation.

Aérosolthérapie anti-Granulocytaire pour le contrôle des pathologies Inflammatoires du Poumon

« AGIP »- Projet d'intérêt régional 2013-2017

Emilie DOZ-DEBLAUWE¹, Sandrine LEGUELLEC², Florence CARRERAS¹ Yves LE VERN¹, Thomas BARRANEK³, Dieudonnée TOGBE⁴, Bernhard RYFFEL⁵, Mustapha SI TAHAR³, Nathalie WINTER¹.

(1) ISP, UMR 1282 INRA-Université de Tours ; (2) Aérodrug, Tours ; (3) CEPR UMR 1100/EA6305 INSERM Université de Tours ; (4) Artimmune Orléans ; (5) INEM UMR 7355 CNRS Université d'Orléans

Les granulocytes, jouent un rôle prépondérant dans la tuberculose, la fibrose pulmonaire idiopathique ou le syndrome de détresse respiratoire aigüe. Parmi les granulocytes, les neutrophiles sont recrutés rapidement pour éliminer les germes mais lorsque leur recrutement n'est pas contrôlé, détruisent le poumon. Les Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) surtout décrites dans le cancer, sont d'autres granulocytes phénotypiquement très proches des neutrophiles. Les MDSC suppriment la prolifération et l'activité des lymphocytes T et facilitent la chronicité de l'inflammation.

Le projet AGIP avait pour but de décrire et contrôler les sous populations de granulocytes recrutées dans des modèles murins de pathologies respiratoires décrites ci-dessus. Nos travaux ont permis d'isoler et de caractériser des MDSC et des neutrophiles, *in vitro* et *ex vivo*. Dans le but d'établir une stratégie thérapeutique ciblant les MDSC, nous avons testé l'ATRA (All *trans* retinoic acid). L'administration par voie aérosol permet d'optimiser la concentration locale de la molécule thérapeutique dans le tissu pulmonaire et de minimiser les effets secondaires. Des aérosols d'ATRA ont été générés *in vitro* à l'aide d'un nébuliseur développé au cours du projet utilisant la technologie des tamis vibrants. Nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de l'ATRA y compris après nébulisation, pour inactiver des MDSC dérivées *in vitro* ou isolées *ex vivo* de poumons de souris.

Ainsi, dans trois modèles murins de pathologies respiratoires qui sont des problèmes majeurs de santé publique, nos travaux démontrent le recrutement complexe de populations de granulocytes phénotypiquement très proches mais fonctionnellement très distinctes. Ils apportent également la preuve de concept que des molécules permettant d'inactiver les MDSC peuvent être nébulisées en gardant leur efficacité. Ceci permet d'envisager des aérosolthérapies ciblées dans le but de détruire les granulocytes délétères pour la réponse immune du poumon.

Thème : Immunité Inflammation

Mots clés : Pathologies pulmonaires, neutrophiles, MDSC, nébulisation

Actes du 30^{ème} Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 12-13 Octobre 2017

L'implication du liquide amniotique dans la défense de l'embryon d'oiseau face aux pathogènes

M. Da Silva¹, M. Chessé¹, M. De Pauw¹, V. Labas², C. Dombre¹, Y. Nys¹, S. Réhault-Godbert¹

¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'Œuf, F-37380 Nouzilly, France

² INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, UMR7247, Université François Rabelais de Tours, IFCE, Nouzilly F-37380, France

Le liquide amniotique (LA) protège l'embryon contre les chocs mécaniques et la déshydratation, et potentiellement contre les pathogènes, comme en témoigne la présence de protéines et peptides antibactériens dans le LA humain ¹. Pour mieux comprendre l'implication du LA d'oiseau dans la protection de l'embryon, nous avons évalué le potentiel antibactérien du LA de l'œuf de poule aux 11^{ème} et 16^{ème} jours du développement embryonnaire, soit avant et après le transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique ². Nous nous sommes également intéressées à une fraction du LA enrichie en protéines qui lient l'héparine (HBP), qui d'après la littérature peuvent présenter des activités antibactériennes ³.

Des tests de diffusion en gélose réalisés à partir d'un gel SDS-PAGE pour les fractions totale et HBP du LA ont démontré l'augmentation progressive de l'activité anti-*Salmonella enterica* Enteritidis (gram -) et anti-*Listeria monocytogenes* (gram +) du fluide au cours du développement, particulièrement concernant la fraction HBP. Les HBP responsables des activités antibactériennes sur gel ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse, ce qui a mené à l'identification de 29 protéines pour les 2 stades étudiés, dont 16 étaient déjà décrites dans la littérature pour leur activité antibactérienne ³ (le lysozyme, la bêta-defensine aviaire de type 11, la bêta-microsémipoprotéine et la vitelline membrane outer layer protein 1...). En outre, des tests antibactériens réalisés sur le blanc d'œuf à différents stades du développement ont confirmé l'impact du transfert du blanc sur les activités du LA. En effet, les HBP présentes et actives dans le LA au 16^{ème} jour du développement correspondent à des HBP initialement identifiées dans le blanc. Une analyse phylogénétique de ces protéines est actuellement en cours pour déterminer leurs spécificités d'espèce.

Ces résultats révèlent que le LA d'oiseau participe à la protection antibactérienne de l'embryon comme chez l'homme, en particulier à partir de la deuxième moitié du développement embryonnaire. En outre, à partir du 13^{ème} jour d'incubation l'embryon commence à absorber oralement les protéines du LA enrichi des protéines du blanc ; l'hypothèse est donc que ces molécules antibactériennes pourraient également contribuer à l'immunité innée du tractus digestif encore immature du poussin, à l'éclosion.

¹ Cho et al. 2017. Mol Cell Proteomics 6 (8): 1406-15

² Da Silva et al., 2017. J Poult Sci Mar 31

³ Guyot et al., 2016. Sci Rep 6: 27974

Thème : Biologie du développement

Mots-clés : liquide amniotique, embryon de poule, activité antibactérienne, protéines liant l'héparine

Stimulation Of P2Y11 Receptor Modulates Cardiac Fibroblasts Secretome Towards Immunomodulatory And Protective Roles After Simulated Ischemia/Reperfusion Injury

Claudie Lefort¹, Lauriane Benoist¹, Thierry Bourguignon^{1,2}, Stéphanie Chadet¹, Elodie Miquelestorena-Standley¹, Marie Piollet¹, Audrey Heraud¹, Dominique Babuty^{1,3}, Christophe Baron¹, Fabrice Ivanès^{1,3}, Denis Angoulvant^{1,3}

¹EA4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes, Université François Rabelais Tours, Tours, France

²Service de Chirurgie Cardiaque, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France

³Service de Cardiologie, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France

Introduction : Ischemia/Reperfusion (I/R) injuries are involved in many myocardial pathologic processes. Cardiac fibroblasts (CF) respond to this stress by excessive proliferation and secretion of soluble factors, e.g. ATP, leading to purinergic receptors activation. We previously showed that P2Y11 receptor (P2Y11R) played an immunomodulatory role in human dendritic cells (DC). We aimed to investigate the role of human CF P2Y11R stressed by I/R on immune response modulation and cardiac protection.

Methods : Adult ventricular human CF were subjected to simulated I/R (5h at 1%O₂ and 24h at 21%O₂). CF secretome (CFS) was analyzed by bioluminescence and Multiplex assays following reperfusion. DCs maturation markers were analyzed by flow cytometry after a 48h incubation with CFS. Human cardiomyocytes (CM) were subjected to 5h/1h I/R and CFS was added at the onset of reperfusion. CM viability was assessed after I/R. We then investigated the role of P2Y11 signaling in a murine in vivo model of allogeneic heterotopic heart transplantation.

Results : I/R induced CF proliferation (+8,7%, p<0,001), ATP secretion (+31,7%, p<0,001), and IL-6 secretion (+27,1%, p<0,05). Stimulation of CF P2Y11R with NF546 reduced I/R-induced proliferation (-10% vs I/R, p<0,01), and decreased ATP and IL-6 secretion (respectively -28%, p<0,05 and -31%, p<0,01 vs I/R). CFS increased CD83, CD25 and CD86 expression in DC (respectively +30%, +26% and +23%), suggesting a switch of DC from immature to mature phenotype. Pre-treatment of CF with NF546 reduced CFS effect (respectively -16%, -8 and -7% for CD83, CD25 and CD86 vs I/R). P2Y11R inhibition with NF340 abolished this effect. CFS protected CM from I/R injury (+28,7%, p<0,001). NF340 inhibited CFS protection on CM (-26,8%, p<0,01). In vivo data showed a significant increase in cardiac allograft survival following NF546 injection compared to saline (9.6±1.9 vs 8.2±1.4 days, p=0.04), suggesting in vivo protection by P2Y11R stimulation.

Conclusion : Our data demonstrated a paracrine link between CF, CM and DC after I/R suggesting a key role of CF in the cellular responses to reperfusion. P2Y11R seems to modulate myocardial I/R injuries, especially by acting on CF secretome that may explain part of the in vivo observed beneficial effects.

Thème : Cardiologie, Immunologie

Mots clés : Ischémie/Reperfusion, Fibroblastes Cardiaques, Cardioprotection

Effet immunomodulateur des protéases du neutrophile sur les cellules NK « Natural-Killer »

Valayer A¹, Brea D¹, Avezard L¹, Lajoie L², Labas V³, Combes-Soia L³, Thibault G², Baranek T¹ et Si-Tahar M¹

¹. Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), Inserm U1100, Université François-Rabelais, Tours; ². CNRS UMR 7292 Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Université François-Rabelais, CHRU de Tours;

³. INRA, UMR85, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Nouzilly

Au cours d'une infection, la réponse inflammatoire qui est induite, est caractérisée par le recrutement massif de cellules immunitaires ainsi que par des interactions entre ces différents types cellulaires. Un dialogue intercellulaire a notamment été décrit entre les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les cellules Natural-Killer (NK). Le fonctionnement des cellules NK dépend de l'activité de récepteurs inhibiteurs ou activateurs tel que le NKp46, situés à la surface de ces leucocytes. Par ailleurs, les PNN activés sécrètent de multiples médiateurs solubles tels que des protéases.

L'objectif de ce projet de thèse est de déterminer l'impact de l'activation des PNN sur l'expression des récepteurs présents à la surface des cellules NK. Nous avons dans un premier temps montré que la cathepsine G, une sérine-protéase produite par les PNN humains activés, clive le récepteur activateur NKp46 présent à la surface des cellules NK. Ce clivage est spécifique et a des conséquences fonctionnelles majeures car les cellules NK incubées en présence de cathepsine G perdent leur capacité à s'activer en réponse à la stimulation du NKp46. Ainsi, cette étude met en évidence un nouveau mécanisme de régulation protéolytique de l'activité des cellules NK par les PNN.

Thème : Immunité

Mots-clés : Inflammation, Natural Killer, Protéases, Neutrophiles

Traitement peptidique des maladies autoimmunes inflammatoires

Sylviane Muller^{1,2,3}

¹CNRS UPR3572 Immunopathologie et Chimie thérapeutique
Institut de Biologie Moléculaire & Cellulaire, Strasbourg

²Laboratoire d'Excellence Centre de recherche du Médicament Medalis

³Institut d'Etude Avancée Université de Strasbourg (USIAS)

Les maladies autoimmunes sont la conséquence d'une réponse immune dirigée contre l'organisme lui-même, anormalement considéré comme étranger. Prototype des maladies autoimmunes, le lupus érythémateux disséminé se caractérise par un état inflammatoire et des dommages variés dans des tissus sains. Les traitements actuels sont principalement basés sur des médicaments de type immunosuppresseurs qui engendrent de nombreux effets secondaires, parfois très délétères. Il y a donc un besoin urgent de développer des stratégies efficaces et sans danger pour contrôler ce syndrome complexe. Dans ce cadre, le peptide synthétique P140/Lupuzor™ est un candidat-médicament très prometteur. Ce phosphopeptide est stable, soluble et a montré son efficacité et son innocuité dans un essai clinique de phase IIb. Il est en cours d'évaluation dans un essai de phase III mené par la société ImmuPharma aux US, en Europe et à l'île Maurice. Le P140 n'est pas un immunosuppresseur. Il cible les lymphocytes T auxiliaires autoréactifs qui sont anormalement hyperactivés dans le lupus, et ce faisant il engendre une réduction de la différenciation des lymphocytes B autoréactifs et la sécrétion d'autoanticorps circulants pathogènes. Nos résultats récents concernant son mécanisme d'action qui touche les processus autophagiques, nous permettent de mieux comprendre comment un seul peptide peut contrôler une maladie systémique aussi hétérogène que le lupus et exercer son activité remarquable chez les patients atteints par ce désordre autoimmun particulièrement handicapant. Nos travaux ouvrent la voie à de nouvelles approches pharmacologiques pour le traitement ciblé et sans effets indésirables de nombreuses maladies inflammatoires, autoimmunes ou non, dans lesquelles les voies de l'autophagie sont altérées.

Thème : Autoimmunité, peptides thérapeutiques ; médicaments innovants

Mots clés : Peptide thérapeutique ; P140/Lupuzor™ ; autophagie ; lupus, lymphocytes autoréactifs ; maladies autoinflammatoires ; essais cliniques.

Localiser et suivre l'interaction entre la protéine Gag et ses partenaires cellulaires ou comment comprendre l'assemblage du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

Hugues de Rocquigny^{1,2}, Salah El Meshri¹, Emmanuel Boutant¹, Ludovic Richert¹, Yves Mély¹

1 –CNRS UMR 7213, Laboratoire de biophotonique et pharmacologie, 74 route du Rhin, 67340, Illkirch, France
2- Nouvelle adresse : Inserm - U966 MAVIVH, Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites -
10 boulevard Tonnellé - BP 3223 37032 Tours Cedex 1 - France

Le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) est un rétrovirus enveloppé qui possède deux ARN génomiques encapsidés sous forme dimérique. Outre ces ARN viraux, la capsid renferme aussi des protéines cellulaires et virales (protéines accessoires). Au cours du cycle réplcatif, cet ARN viral est aussi un ARN messager qui est traduit pour donner notamment naissance à la polyprotéine de structure Gag. La formation des particules de VIH résulte de l'assemblage d'environ 2000 unités de ces protéines Gag qui se décorent des protéines d'enveloppe virale lors du bourgeonnement et de la sortie du virus hors de la cellule [1].

Comprendre avec finesse l'ensemble des étapes orchestrant la formation du VIH constitue un enjeu majeur pour le développement des molécules thérapeutiques de demain. Or, malgré de nombreuses études, le site intracellulaire précis abritant l'assemblage viral demeure controversé. Certains travaux suggèrent que la protéine Gag s'oligomérisse dans le cytoplasme avant que ces oligomères ne migrent vers la membrane plasmique. Au contraire, d'autres travaux proposent que la protéine Gag monomérique s'accumule à la périphérie de la cellule avant de s'oligomériser et de bourgeonner.

Pour clarifier cette étape du cycle viral, nous avons utilisé des cellules exprimant la protéine Gag fluorescente que nous avons suivies au cours du temps par différentes approches de microscopie quantitatives [2]. Nous avons pu observer que l'oligomérisation de Gag était principalement initiée dans le cytoplasme et qu'ensuite ces oligomères s'accumulaient rapidement au niveau de la membrane plasmique [3]. Ce suivi intracellulaire a été appliqué à d'autres cibles virales et cellulaires montrant que Gag recrute dans la cellule de nombreux partenaires qu'elle encapside dans les particules virales naissantes. Ainsi, Gag serait une plateforme d'assemblage sur laquelle viennent se condenser de nombreux interactants qui sont ensuite utilisés lors des différentes étapes du cycle. Enfin, étendre ces études de suivi dynamique de la formation intracellulaire du virus pourrait permettre de développer *in fine* un test simple d'imagerie visant à valider des molécules anti-virales candidates à la déstabilisation de cette plateforme d'assemblage du VIH.

[1] Muriaux D, Darlix JL. RNA Biol. 2010;7:744-53.

[2] de Rocquigny H, Gacem H, Didier P, Darlix JL, Mely Y. Fluorescent Methods to Study Biological Membranes, Springer Series on Fluorescence, Springer Berlin Heidelberg. 2012;13:457-78.

[3] El Meshri SE, Dujardin D, Godet J, Richert L, Boudier C, Darlix JL, Didier P, Mely Y, de Rocquigny H. J Mol Biol. 2015;427:1480-94.

Agents de contraste "intelligents" à base de Lanthanide(III) pour l'Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire

Célia Bonnet

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2

L'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM) a longtemps été réduite à l'obtention d'images anatomiques et fonctionnelles. Récemment de nouvelles applications dans le domaine de l'Imagerie Moléculaire (IM) ont vu le jour. L'IM cherche à obtenir des informations sur les changements biochimiques et physiologiques sous-tendant une pathologie afin de mieux comprendre cette maladie et d'en faire un diagnostic plus précoce. Contrairement à l'imagerie anatomique, l'IM nécessite l'utilisation d'un agent de contraste spécifique du processus moléculaire que l'on cherche à détecter.

Les complexes de Ln^{3+} sont particulièrement adaptés à ce type d'application. En effet, les complexes de Gd^{3+} sont de bons agents de contraste de type T_1 et le plus souvent, les changements d'efficacité (relaxivité) obtenus sont basés sur des changements de nombre d'hydratation et/ou de dynamique de rotation des complexes ; ces deux paramètres étant les plus simples à moduler par le chimiste. Récemment, une nouvelle technique IRM basée sur l'échange chimique est également apparue, et les complexes de Ln^{3+} paramagnétiques sont apparus comme des agents ParaCEST prometteurs. Leur efficacité peut également être modulée par divers paramètres physiologiques qui modifieront alors le déplacement chimique et/ou la vitesse d'échange d'un proton échangeable.¹

Nous présenterons des exemples de sondes « intelligentes » de type T_1 pour la détection du Zn^{2+} ² et du pH^3 et de sondes ParaCEST pour la détection de l'activité enzymatique⁴.

1. C.S. Bonnet, L. Tei, M. Botta, E. Toth, Responsive Probes in "The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging", **2013**, John Wiley & Sons, Chichester, 343-385.
2. Bonnet, C.S.; Caille, F. et al. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 10959-10969.
3. Carné-Sanchez, A., Bonnet, C.S. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 17711-17714; Arinez-Soriano, J.; Aladad, J. et al. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 13162-13170.
4. He, J., Bonnet, C.S. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 2913.

Sustainable production of innovative active ingredients for the personal care industry

Dr Franck Michoux

Director of Evonik Advanced Botanicals

A recent development in the field of personal care is the use of biotechnologically derived active ingredients. Along with classical bacterial, fungus and yeast fermentations, plant biotechnology is offering new possibilities for the development of novel ingredients. In the last 10 years, undifferentiated cells cultures, also described as Plant Stem cells in the industry, were a major innovation driver in the plant-based active ingredients. However, strong regulation from China in particular is limiting the expansion of such specific plant extracts. Evonik Advanced Botanicals (EAB) has developed several technologies, which allow for the production of organ cultures, namely shoot and/or root cultures in temporary immersion bioreactors, therefore enabling active ingredients to be produced according to stringent sustainability profiles along with an easy access to the Chinese Market. We will present to you several possibilities of plant metabolite optimization using plant biotechnologies in a non-GMO environment.

Cytochromes P450 : support à la découverte du métabolisme végétal et de son évolution

Hugues Renault¹, Benoit Boachon¹, Zhenhua Liu¹, Alexandra Baslio Lopes², Tina Ilc¹, Annette Alber¹, David Halter³, Lucie Krieghauser¹, Pascaline Ullmann¹, Raymonde Baltenweck³, Philippe Huguene³, Eric Duchêne³, Martine Schmitt², Laurence Miesch⁴, Nicolas Navrot¹ & Danièle Werck-Reichhart¹

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (IBMP-UPR2357)

²Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR CNRS 7200, Illkirch

³Laboratoire Métabolisme Secondaire de la Vigne, INRA, Colmar

⁴Laboratoire de Chimie Organique Synthétique, CNRS, Université de Strasbourg,

Les cytochromes P450 constituent la plus vaste famille d'enzymes participant au métabolisme végétal. Les réactions qu'ils y catalysent (à la base essentiellement des réactions d'oxygénations) sont très variées, lentes et cinétiquement limitantes, contribuant à toutes les voies métaboliques. Le grand nombre de gènes codant pour ces enzymes révélé par les récentes initiatives de séquençage permet de porter un nouveau regard sur le métabolisme végétal et son évolution, ouvrant de nouvelles perspectives. Cette information permet en effet la découverte accélérée de nouvelles voies métaboliques de fort intérêt économique (conduisant à la synthèse de médicaments, arômes, parfums, pigments, biopesticides) et ouvre la voie à diverses possibilités de biosynthèse combinatoire et de biologie synthétique. Mais elle permet surtout une approche plus phylogénomique du métabolisme. Elle démontre en effet que gènes les plus conservés au cours de l'évolution participent de manière évidente à la mise en place de fonctions essentielles comme la synthèse d'hormones ou de biomolymères. Certaines de ces fonctions semblent être restées inexplorées. Elle révèle aussi des familles plus spécialisées dans des processus adaptatifs et l'interaction avec d'autres organismes, dont l'évolution est beaucoup plus rapide et spécifique au sein des espèces végétales. Ces constatations permettent désormais de révéler de nouvelles fonctions essentielles du métabolisme végétal, de dater l'évolution des différentes voies métaboliques, d'analyser les mécanismes évolutifs mis en œuvre pour l'acquisition de nouvelles fonctions.

Thème : Métabolisme végétal et biotechnologies

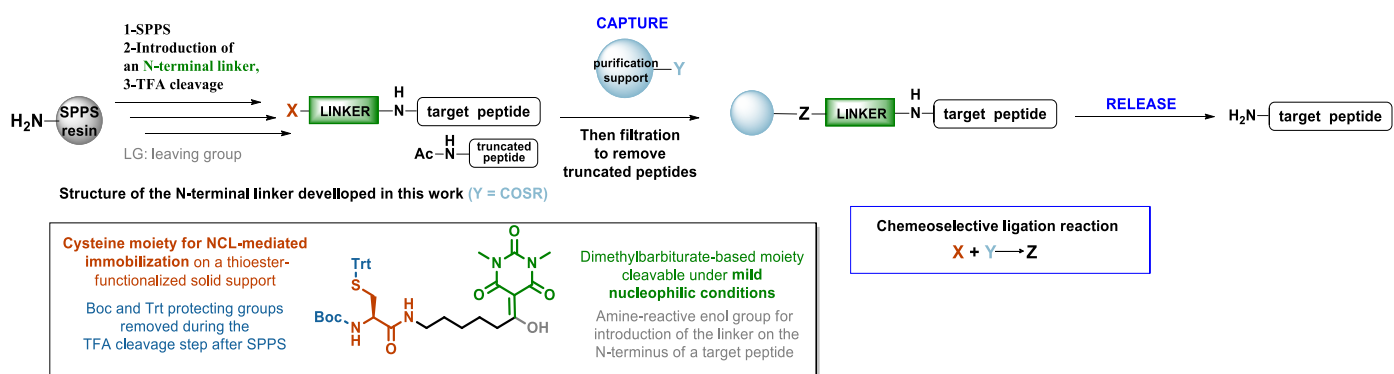
Mots clés : Oxygénases, familles multigéniques, évolution, métabolisme spécialisé, développement, adaptation, applications.

A promising N-terminal linker to simplify the synthesis of disulphide-rich peptides

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

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

Disulfide-rich peptides (DRPs) are bioactive natural products binding a wide number of therapeutically-relevant targets. They are considered as promising drugs candidates and pharmacological tools. However, the chemical synthesis of long DRPs (> 40 amino acids) is severely limited by complex and time-consuming HPLC purifications leading to low yields and poor purities. We recently started re-investigating the use of N-terminal linkers as “chemical tags” for the non-chromatographic catch-and-release purification of peptides.¹ Such linkers can be selectively introduced at the N-terminus of a target peptide, leaving unreacted truncated acetylated peptides, the main co-products of SPPS. After cleavage from the SPPS resin, the target peptide is immobilized on a second solid support through a chemoselective ligation reaction. A simple filtration step then removes truncated peptides. Cleavage of the linker finally releases the purified peptide into solution. Previously developed linkers involve ligation or cleavage reactions difficultly compatible with unprotected cysteines. We report herein a novel linker fully compatible with cysteine-rich peptides, making use of the native chemical ligation reaction (NCL) for the immobilization step, and its application to the production of several biologically-relevant long DRPs. This work also paves the way the synthesis of longer proteins, through multiple successive solid supported NCLs.



References

- (1) a) Aucagne, V. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11320–11324. b) Galibert, M. et al. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 3617–3623.

Key words: disulfide-rich peptides, N-terminal linker, *catch-and-release* purification, NCL

Les grandes algues marines : source de molécules bioactives pour le bien-être de la peau

Syntia Fayad, Reine Nehmé, Philippe Morin

Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans - CNRS, UMR 7311, Orléans, France

Le vieillissement de la peau est l'un des signes extérieurs du passage des années. Avec l'âge, la peau devient plus sèche et finement ridée suite à la dégradation des macromolécules du derme par des enzymes telles que l'élastase, l'hyaluronidase et la collagénase. La recherche de molécules naturelles inhibitrices de ces enzymes est ainsi l'enjeu actuel. Les plantes en général et notamment les algues contiennent des ingrédients actifs pour le bien-être de la peau.

Dans ce travail, la cinétique de l'élastase, l'hyaluronidase et la collagénase a été étudiée par électrophorèse capillaire. Des essais hors-ligne et en-ligne où le capillaire sert de nanoréacteur enzymatique ont été développés avec la détermination des constantes cinétiques (Fayad S., *J. Chromatogr. A*, 2015, 1419). L'utilisation de différents types de détecteurs tels que la fluorescence et la spectrométrie de masse a permis une amélioration de sensibilité (x1000 par rapport à l'UV) et un apport d'informations structurales et massiques sur les produits réactionnels. L'effet d'extraits d'une algue brune, la *Padina pavonica*, et d'une algue rouge, la *Jania rubens*, était par la suite étudié. L'extraction de ces dernières a été réalisée par différentes techniques dont l'électroporation qui est basée sur l'application d'une tension électrique autour de la paroi d'un végétal pendant un certain temps d'extraction (Fayad S., *J. Chromatogr. A*, 2017, 1497). Les extraits obtenus ont montré un effet important sur les enzymes de la peau. Un fractionnement par chromatographie sur couche mince ou chromatographie semi-préparative nous permettra par la suite de trouver la ou les molécules bioactives. Les essais développés dans ce travail sont simples, économes et sensibles. Ils seront des atouts pour le criblage de la bioactivité d'extraits de végétaux et à la recherche de nouveaux inhibiteurs des enzymes de la peau pour des applications cosmétiques, voire thérapeutique.

Thème : Chimie analytique

Mots-clés : algue, cinétique enzymatique, électrophorèse capillaire, extraction

Segmentation de l'os corticale et analyse de texture pour la prédiction des fractures ostéoporotiques

Mohamed HAFRI¹, Rachid JENNANE¹, Hechmi TOUMI¹, Eric LESPESSAILLES²

¹ Laboratoire I3MTO Université d'Orléans

² Nouvel Hôpital Orléans la source

L'os est un tissu vivant qui suit un cycle permanent de formation et de destruction. Ce phénomène s'appelle le « remodelage osseux » est dirigé par deux types de cellules : les ostéoclastes et les ostéoblastes. Dans le cadre de ce processus, le corps utilise des calciums et des phosphates afin de produire des os solides pendant la jeunesse, mais, si l'apport en calcium ou les hormones sexuelles est insuffisant, la production du tissu osseux risque d'en pâtir. Ceci est appelé l'ostéoporose, une maladie caractérisée par une réduction progressive de la densité des os et une détérioration de leur microarchitecture interne résultant un risque accru des fractures. Un diagnostic précoce de l'état de l'os peut aider à prévenir la fragilité osseuse. Pour cette raison, l'attention est de plus en plus axée sur l'identification des patients à risque élevé de fracture plutôt que les personnes atteintes d'ostéoporose, ceci est le but de notre étude. Nous utilisons des images 3D *HRpQCT* (High resolution peripheral quantitative computed tomography) pour effectuer une analyse approfondie de l'os cortical (la partie de l'os responsable de sa force et de sa raideur) pour extraire de nouveaux facteurs de risque de fracture. Tout d'abord, nous avons développé une méthode de segmentation pour séparer entre les différents parties de l'os (Corticale et Trabéculaire). Ensuite, nous avons mis en place des techniques permettant d'accéder à la morphologie 3D de l'os cortical afin de mesurer l'épaisseur de ce dernier, la taille des pores, et leurs nombres, etc. Ceci nous permet de mieux comprendre le rôle de ces facteurs dans la progression de l'ostéoporose et la construction d'un système capable de prédire les fractures osseuses. Enfin, afin de valider la démarche proposée, des expérimentations ont été menées sur une base de données d'images *HRpQCT* composée de femmes ménopausées. Cette base est toujours en construction à l'hôpital d'Orléans où l'ostéoporose est observée de manière prédominante.

Thème : Prédiction des fractures ostéoporotiques en utilisant l'imagerie *HRpQCT*

Mots-clés : ostéoporose, os corticale, fracture, segmentation

Nouveaux modèles pour la mise en œuvre de l'évaluation pan-génomique dans le programme d'amélioration des peupliers

Marie PEGARD^a, Véronique JORGE^a, Facundo MUNOZ^a, Vincent SEGURA^a, Catherine BASTIEN^a,
Léopoldo SANCHEZ^a

^a UR588 AGPF - Inra - Val de Loire - 2163, avenue de la pomme de pin - CS 40001 Ardon - 45075 Orléans
Cedex 2

Le processus d'évaluation, même pour une espèce à croissance rapide comme le peuplier, est lent et coûteux et ne permet pas de s'adapter rapidement aux nouvelles demandes ou défis environnementaux. La sélection génomique (SG) permettrait de répondre à ces problématiques, elle repose sur la possibilité d'évaluer (classer) les candidats en utilisant l'information contenue dans le génome, associée au pedigree et au phénotype. La présente étude fournit des évaluations préliminaires de la faisabilité de SG dans un sous-ensemble de la population d'amélioration du peuplier noir français. Les traits évalués sont la croissance, la résistance aux maladies et l'évaluation de l'architecture des branches. Tous les individus ont été génotypés grâce à une puce SNP 12K récemment développée, qui a produit dans notre pedigree 7812 SNP utilisables. Plusieurs modèles génomiques ont été appliqués à l'aide du logiciel GS3 Logiciel. Les résultats ont fourni des capacités de prédiction pour chaque trait obtenu à partir d'une approche de validation croisée. Les précisions de ces prédictions diffèrent selon l'architecture et l'héritabilité de ces traits.

Thème : Amélioration variétale, génétique quantitative

Mots-clés : Sélection Génomique, peuplier, diversité génétique, prédiction

Influence du microbiote intestinal initial sur les comportements émotionnels de la caille japonaise (*Coturnix japonica*)

Narijs Kraïmi¹, Ludovic Calandreau¹, Sylvie Rabot², Edouard Guitton³, Sebastien Lavillatte³, Patrice Cousin³, Olivier Dubes³, Philippe Velge⁴, Sandrine Riviere⁵, Paul Constantin¹, Manon Biesse¹, Christine Leterrier¹.

- (1) UMR PRC INRA - CNRS - Université de Tours - IFCE, Equipe « Comportement, Neurobiologie, Adaptation », 37380 NOUZILLY, France. (2) UMR MICALIS INRA F-78350 JOUY-EN-JOSAS, France-AgroParisTech. (3) UE PFIE INRA 37380 NOUZILLY, France. (4) UMR IPS INRA 37380 NOUZILLY. (5) UE PEAT INRA 37380 NOUZILLY, France.

Depuis quelques années, il a été montré que le microbiote intestinal (MI) peut influencer le comportement de l'hôte et qu'il existerait un axe microbiote-intestin-cerveau. Cependant, les travaux sur le sujet manquent cruellement chez l'oiseau. Aussi, ce travail vise à tester l'hypothèse selon laquelle le MI de la caille japonaise (*Coturnix japonica*) a des conséquences sur ses comportements émotionnels. Dans une première expérience, nous avons testé les effets de l'absence de MI. Nous avons donc comparé les réponses comportementales de 12 cailles axéniques (sans MI) et de 12 cailles implantées avec un MI dans diverses situations génératrices d'émotions. Comparées aux cailles axéniques, les cailles implantées ont une durée d'immobilité tonique plus élevée et parcourent une distance plus importante lors de l'isolement social, ce qui suggère que l'absence de MI réduit la réactivité émotionnelle des cailles. Dans une seconde expérience, nous avons fait l'hypothèse que le MI d'une lignée peu émotive (MI E-) réduirait l'émotivité d'une lignée de cailles très émotive (lignée E+). Des cailleaux de la lignée E+ ont éclos en conditions d'axénie et ont été répartis dans deux isolateurs. Dans l'un, ils ont été inoculés à J1 avec le MI de cailles de leur lignée (lot E+/MI+) et dans l'autre, avec le MI de la lignée moins émotive (lot E+/MI-). La durée d'immobilité tonique du lot E+/MI+ est plus élevée que celle du lot E+/MI- à J15 mais cette différence s'inverse à J29. En conclusion, l'absence de MI ou l'inoculation d'un MI d'une lignée peu émotive réduit la réactivité émotionnelle des cailles E+, conformément à notre hypothèse. Cependant, dans le deuxième cas, cette réactivité émotionnelle augmente ultérieurement, ce qui pourrait être lié à une réaction des cailles E+ vis-à-vis d'un MI non adapté à leur tube digestif. Ces résultats sont donc encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'influence du MI sur les comportements chez l'oiseau.

Mots clés : caille japonaise, microbiote intestinal, axe microbiote-intestin-cerveau, comportement émotionnel

***In Silico* Structural Homology Modeling and Docking of Antibodies**

Shifa Tahir, Thomas Bourquard, Anne Poupon

PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

Antibodies are successfully used as therapeutic agents against number of diseases. Computational methods such as molecular modeling and docking are hot topics in antibody development. We have developed an accurate approach (MAbTope) for determining the epitope of an antibody, based on computational protein-protein docking and experimental validation methods. This approach correctly determines the epitope for every single example of our antibody complexes benchmark (152 antibody-target complexes) when 3D structures of both isolated proteins are available in protein data bank (PDB). It allowed us to determine and validate the epitope of two therapeutic antibodies of unknown 3D structure. We now need to better evaluate the performance of our method when the structure of the antibody is unknown. To that purpose, we have selected those antibody-target complexes for which unbound 3D structures of antigen are known, but that of the antibody are unknown. We have generated models of the antibody structures using homology modeling and then performed docking to evaluate our method. On a data set of 26 antibody complexes, representing different possible situations, the epitope is correctly predicted for 25. These results are very promising and show the robustness of the method.

Thème : homology modeling and docking

Mots-clés : homology modeling, 3D structure prediction, antibody modeling, epitope prediction, docking of antibodies

La cytométrie de masse dans l'ère phénoménique: un outil essentiel pour l'étude fonctionnelle des gènes

GREGORI E. ^{1,2,3,4}, MARTINEZ M. ^{1,2,3,4}, NARDINI J. ^{1,2,3,4}, IVANOV R. ^{1,2,3,4}, MALISSEN M. ^{1,2,3,4,5},
LUCHE H. ^{1,2,3,4}.

1. Centre d'Immunophénomique (CIPHE)
2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) US012, Marseille, France
3. Aix-Marseille Université, UMS3367, Marseille, France
4. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMS3367, Marseille, France
5. Centre d'Immunologie de Marseille Luminy (CIML)

One challenge in current biology is to characterize the function of the 20.000 genes found in our genome. The possibility to “edit at-will” the murine genome is currently the most reliable approach to link the expression of a gene to a given physiological function. To characterize the impact of a gene invalidation, cellular immune-phenotyping is required. Essentially based on an extracellular labelling, this primary screen aims at quantifying the various cell populations present within a model. This first approach describing cellular heterogeneity does not assess the effector/functions of immune cells. To this end, a more functional secondary immune-phenotyping screen is required. Mass cytometry is the technique of choice in that respect.

Mass cytometry is an emerging technique for single cell analysis (1). Mass cytometry principle is similar to flow cytometry but the detection unit differs as antibody/metal conjugates are used. Each metals are identified depending on their isotopic mass in a TOF chamber. Surface markers (1) but also more functional markers (2) as well as RNA (3) can now be investigated simultaneously by mass cytometry.

Effector/function capacities of immune cells are traditionally assayed by extensive characterization of cytokine production, the detection of master gene regulator of transcriptional program and more recently intracellular signaling. We investigate a set of these hallmarks (12 cytokines, 15 phospho-modifications, 7 transcription factors) at the single cell level on 8 different lineages by mass cytometry on the same mice.

Probing all cellular compartments by mass cytometry in one set of simultaneous measurement on all immune cell lineages in several immune stages will increase the chances to identify the functional relevance of a gene in the immune system.

References

1. Bendall SC et al. 2012. A deep profiler's guide to cytometry. Trends in Immunology 33(7): 323-32.
2. Bodenmiller B et al. 2012 Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. Nature Biotechnology 30(9):858-67
3. Frei AP et al. 2016. Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. Nature Methods, 13(3):269-75.

Thème : Immuno-phenotyping, Immuno-monitoring

Mots clés : Functional Phenotyping, Single cell analysis, Multiparametric, Mass cytometry, Unsupervised Data Analysis

Biotechnologies ancestrales : utilisations récurrentes de virus par les guêpes parasites pour délivrer des molécules de virulence

Matthieu LEOBOLD, Jérémy GAUTHIER, Annie BÉZIER, Thibaut JOSSE
George PERIQUET, Elisabeth HERNIOU, Elisabeth HUGUET, Jean-Michel DREZEN

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte UMR CNRS 7261/ Université François Rabelais, Parc de Grandmont 37200 Tours

Les guêpes endoparasitoïdes sont des organismes dont le développement larvaire s'effectue à l'intérieur d'un hôte arthropode, source de sa nourriture. Le succès du parasitisme dépend principalement de la capacité à échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et à réguler sa physiologie. Ces contraintes ont généré l'adoption par les guêpes de stratégies de virulence très variées, reposant sur l'injection par la femelle, lors de la ponte dans l'hôte, de facteurs de manipulation de la physiologie de l'hôte, nommés «facteurs de virulence». En particulier, les guêpes parasites ont capturé et domestiqué des virus plusieurs fois au cours de leur évolution. Ceux-ci leurs servent « d'outils biotechnologiques » pour introduire des molécules de virulence dans les cellules de l'hôte. Le matériel génétique des virus capturés réside de manière permanente dans le génome des guêpes et est transmis verticalement. Les particules virales produites dans les ovaires sont injectées avec les œufs dans le corps de l'hôte. Les particules virales contenant des molécules d'ADN (polydnavirus) délivrent des gènes de virulence provenant du fond génétique de la guêpe qui sont exprimés par les cellules de l'hôte au cours du parasitisme. Dans le cas des particules sans ADN (nommées VLP), les enveloppes virales servent à délivrer des protéines de virulence produites par la guêpe. Ces guêpes pratiquent donc aussi bien le transfert de gènes que l'utilisation de liposomes depuis des millions d'années. Grâce au développement de la génomique, la connaissance de ces systèmes a fait des progrès considérables et pourrait inspirer de nouvelles approches pour délivrer des gènes ou des protéines à des fins médicales.

Thème : Caractérisation de virus endogènes de guêpes parasites utilisés pour délivrer des molécules de virulence

Mots clés : virus, guêpes parasitoïdes, transfert de gènes, polydnavirus, liposomes viraux

Posters

Filière A

PA1- Délivrance de siRNA à l'aide de nanovecteurs magnétiques dans des cellules du cancer du sein triple négatif

S. Ben Djemaa, E. Allard-Vannier, K. Hervé-Aubert, J. Bruniaux, L. Lajoie, A. Falanga, S. Galdiero, I. Hourpa, E. Munnier, S. David

PA2- Induction of stilbenoid metabolism in grape wood stored as freshly-pruned byproduct

Kévin Billet, Sébastien Besseau, Céline Mélin, Audrey Oudin, Gaëlle Glévarec, Vincent Courdavault, Marc Clastre, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Arnaud Lanoue

PA3- Détection de variations structurales déséquilibrées potentiellement délétères chez des patients autistes au sein d'une population Moyen-orientale

Tania Bitar, Sandrine Vonwill, Sylviane Marouillat, Walid Hleihel, Christian R. Andres

PA4- Topical phage therapy efficiently treats acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice

Bodier-Montagutelli E., Dalloneau E, Pallaoro N., Fevre C., Morello E., Respaud R., L'Hostis G., Gabard J., Vecellio L., Heuzé-Vourc'h N.

PA5- Lack of FcRn induced impairment of NK cell functions in the tumor microenvironment

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

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

Diana Cadena Castaneda, Christine Dhommée, Thomas Baranek, Emilie Dalloneau, Laurie Lajoie, Nathalie Heuzé-Vourc'h and Valérie Gouilleux-Gruart

PA7- Protéolyse de la région charnière des immunoglobulines G et conséquences fonctionnelles : Application aux anticorps thérapeutiques

Quentin Deveuve, Laurie Lajoie, Valérie Gouilleux-Gruart, Gilles Thibault

PA8- Mise au point d'un modèle *in vitro* d'étude de la niche leucémique

Margaux Deynoux, Nicola Sunter et Frédéric Mazurier

PA9- Skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in cancer cachexia : clinical and mechanistic approaches

Dolly A, Cournet J, Dumas JF, Servais S

PA10- Régulation du canal SK3 par l'AlkylGlycerone Phosphate Synthase dans des cellules de cancer du sein

D. Fontaine, A.-M. Bouchet, M. Potier-Cartereau, P. Besson, M. Pinault, A. Chantôme, C. Vandier

PA11- Molécules amphiphiles modulatrices du canal SK3, vers une nouvelle thérapie anti-métastatique ciblant le complexe ORAI1/SK3

S. Kouba, R. Felix, J. Braire, A. Chantôme, J. Lebreton, C. Vandier, M. Mathé-Allainmat and M. Potier-Cartereau

PA12- Molecular imaging coupled to advanced chemometrics methods for cosmetic bioactive compounds detection and tracking in complex biological matrices

L. Miloudi, F. Bonnier, A. Tfyli, I., F Yvergnaux, I. Chourpa, E. Munnier

PA13- Quantitative analysis of in complex formulation using FTIR-ATR and Raman spectroscopy

L. Miloudi, F. Bonnier, D. Bertrand, Xavier Perse, I. Chourpa, E. Munnier

PA14- Expression and role of pore-forming and auxiliary subunits of voltage-gated sodium channels in pH regulation and invasive properties of human colorectal cancer cells

Lucile Poisson, Frédéric Gradek, Lucie Brisson, Emeline Bon, Stéphan Chevalier, Sébastien Roger, Pierre Besson and Driffa Moussata

PA15- Expression and role of pore-forming and auxiliary subunits of voltage-gated sodium channels in pH regulation and invasive properties of human colorectal cancer cells

Roux B, Picou F., Halty C., Vignon C., Hanna J., Foucault A., Domenech J., Herault O.

PA16- Cathepsin C inactivation impairs membrane expression of proteinase 3, the ANCA antigen in granulomatosis with polyangiitis

Seda SEREN, Sandrine DALLET-CHOISY, Francis GAUTHIER, Sylvain MARCHAND-ADAM and Brice KORKMAZ

PA17- Rôle de protéines cibles dans le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule

Lilian Stapane, Nathalie Le Roy, Jacky Ezagal, Jean-Claude Poirier, Joël Gautron

PA18- Caractérisation des graines des mutants de prénylation chez Arabidopsis

Valentin VERGES, Kévin BILLET, Arnaud LANOUE, Michelle PINAULT, Cyrille GUIMARAES, Stéphan CHEVALIER, Eric DUCOS, Christelle DUTILLEUL et Nathalie GIGLIOLI-GUIVARC'H

PA19- A bradykinin-derived azapeptide as a potent inhibitor of cathepsin K

Mylène Wartenberg, Matthieu Galibert, Fabien Lecaille, Ahlame Saidi, Sylvie Mavel, Alix Joulin-Giet, Brice Korkmaz, Dieter Brömme, Vincent Aucagne, Agnès F. Delmas & Gilles Lalmanach

Filière B

PB20- Effet de concentrations élevées de [NaCl] sur l'orientation de la réponse immunitaire

Sally. Al-Hajj, R. Lemoine, A. Goumard, A. Héraud, P. Gatault, M. Buchler, C. Baron, JM. Halimi

PB21- Rôle du neutrophile au cours du SDRA : Existence de sous-populations fonctionnellement distinctes ?

Florent CREUSAT, Youenn JOUAN, Thomas BARANEK, Mustapha SI-TAHAR et Christophe PAGET

PB22- Vaccin innovant contre la néosporose combinant les antigènes complets et des adjuvants glycolipidiques de Neospora dans une plateforme nanoparticulaire

Débare H, Moiré N, Betbeder D, Carpentier R, Ducournau C, Héraud B, Acosta-Paguay YD, Laakmann J-D, Schmidt J, Schwarz RT, Dimier-Poisson I, Debierre-Grockiego F

PB23- Influence de l'Apolipoprotéine E sur le repliement des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C

Julie Dreneau, Anne Bull, Elodie Beaumont, Philippe Roingear, Audrey Boyer and Jean-Christophe Meunier

PB24- Prior exposure to type I interferon boosts inflammation and bacterial uptake in chicken macrophages

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

PB25- Induction de sous-populations de cellules Dendritiques humaines Tolérogènes par des fragments d'anticorps

N. Kakwata-Deluce, L. Lamendour, Z. Lakhrif, A. Nicolas, A. Di Tommaso, N. Aubrey, V. Chabot, F. Déhaut, F. Velge-Roussel

PB26- Modulation de la prolifération cellulaire par Salmonella Typhimurium

Julien Mambu, Emilie Barilleau, Michel Olivier, Yves Le Vern, Laetitia Fragnet-Trapp, Philippe Velge, Agnès Wiedemann

PB27- Nouvelles approches phénotypiques pour l'exploration des échecs de traitement de l'hépatite B chronique

Julien Marlet, Clément Lier, Denys Brand, Catherine Gaudy-Graffin

PB28- Implication des cellules de Paneth lors de l'infection néonatale par Cryptosporidium parvum

A.F.Nicolosi, M.Marquis, F.Laurent, S.Lacroix-Lamande

PB29- Etude fonctionnelle du système CRISPR/CAS de type IIA de Streptococcus agalactiae en fonction des lignées phylogénétiques

Adeline PASTUSZKA, Emilie CAMIADE, Clément LIER, Laurent MEREGHETTI, Philippe LANOTTE

PB30- Réponses vasculaires aux lésions d'ischémie/reperfusion et implication du récepteur purinergique P2Y11

Piollet M., Lefort C., Benoist L., Chadet S., Ivanes F., Muntean D, Duicu O, Sturza A, Angoulvant D

PB31- The Central Nervous System as a Reservoir of HIV-1 variants resistant to Broadly Neutralizing Antibodies

Karl Stefic , Antoine Chaillon, Mélanie Bouvin-Pley, Alain Moreau, Martine Braibant, Frédéric Bastides, Guillaume Gras, Louis Bernard, Francis Barin

PB32- NS1 des virus influenza : relations structure-fonction pour la recherche de nouveaux anti-viraux

Alan WACQUIEZ, Stéphane GOFFINONT, Virginie NADAN, Franck COSTE, Emmanuel KUT, Bertrand CASTAING et Daniel MARC

Filière C

PC33- Rauvolfia nukuhivensis, a booster of the skin immune system by influencing cutaneous ecosystem and by preparing the innate immune system for a rapid and efficient response

Florence Abdallah, Phila Raharivelomanana, Elise Lupo, Lily Mijouin et Chantal Pichon

PC34- Etude de la sumoylation de la neurofibromine, la protéine responsable de la neurofibromatose de type1

Mohammed Bergoug, Aurélie Cosson, Michel Doudeau, Fabienne Godin, Béatrice Vallée et Hélène Bénédetti

PC35- Development of an original footprinting approach to localize non-covalent ligand binding sites

Teddy BIJOT, Guillaume GABANT, Martine CADENE

PC36- Towards the synthesis of ThyX inhibitors against biowarfare agents

Nicolas. G. Biteau, Florian Chevrier, Vincent Roy, Luigi. A. Agrofoglio

PC37-Impact du statut nutritif azoté sur la dynamique des dysfonctionnements hydrauliques et de l'épuisement des réserves sous des conditions d'irrigations contrastées chez des arbres à croissance rapide (Populus ssp.)

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

PC38- Délivrance d'oligonucléotides linéaires et circulaires pour une thérapie ciblée de STAT3 dans le cancer du sein triple négatif.

G. Casas, P.Baril, A. Delalande, C. Pichon, P. Midoux et J.-M. Malinge

PC39- Synthèse et évaluation biologique de nouveaux dérivés de l'acide éthacrynique comme agents anticancéreux

Abdelmoula ELABBOUCHI, Nabil EL BRAHMI, Serge MIGNANI, Abdelmajid ZIAD, Thierry CRESTEIL, Mosto M. BOUSMINA, Jean-Pierre MAJORAL, Franck SUZENET, Gérald GUILLAUMET, Saïd EI KAZZOULI

PC40- Transcriptomic study of Dunaliella.sp cultivated under stressed conditions: Apoptotic activity of aqueous extract

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

PC41- Arylation directe des 7-azaindazoles dans l'eau

Soukaina FAARASSE, Franck SUZENET, Saïd El Kazzouli, Gérald GUILLAUMET

PC42- Utilisation de la thermophorèse à micro-échelle (MST) pour l'étude des interactions enzyme-inhibiteur

Syntia Fayad, Reine Nehmé, Philippe Morin

PC43- Altérations rétiniennes et hypersensibilité visuelle dans le syndrome de l'X-fragile

Felgerolle C, Pâris A, Ardourel M, Rossignol R, Ranchon-Cole I, Briault S & Perche O

PC44- Développement d'un Polymère à Empreinte Moléculaire pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine

M. Ghazi. Ayari, P. Favetta, V. Hervin, V. Roy, M. Si-Tahar, L.A. Agrofoglio

PC45- Effet de l'intensité de l'exercice sur les réponses à l'apnée dynamique en natation

C. Guimard, K. Collomp, H. Zorgati, S. Brulaire, X. Woorons, V. Amiot, F. Prieur

PC46- Inhibitors of GGL (Glycoglycerolipids) biosynthesis in *E. faecalis*: synthesis and biological evaluation

Justyna Jaszczyk, Cyril Nicolas, Olivier Martin

PC47- Première description cinétique du mécanisme d'échange de chaînes de la protéine HU d'*Escherichia coli*

Justine LARGILLIERE, Rémy LE MEUR, Martine CADENE, Bertrand CASTAING, Karine LOTH, Céline LANDON

PC48- Le venin de frelon: source de molécules bioactives pour la dermocosmétique

Thao Nhi LE, David DA SILVA, Eric DARROUZET, Patrick BARIL, Cyril COLAS, Pierre LAFITE, Richard DANIELLOU, Lucie PETIT LESEURRE, Benoît MAUNIT

PC49- Etude métagénomique des mécanismes nucléaires de contrôle qualité et dégradation de l'ARN

Kévin MOREAU, Aurélie LE DANTEC, Christine MOSRIN-HUAMAN, Benoît PIEGU* et Yves BIGOT* & A. Rachid RAHMOUNI

PC50- Identification des sites de terminaison de transcription Rho-dépendantes dans les génomes bactériens

Cédric Nadiras, Eric Eveno, and Marc Boudvillain

PC51- Peupliers hypométhylés & stress hydrique : Rôle de la méthylation de l'ADN dans la modulation de la réponse au stress hydrique

Mamadou Dia Sow, Anne-Laure Le Gac, Sophie Lanciano, Alain Delaunay, Isabelle Le Jan, Jorg Tost, Vincent Segura, Cristian Chaparro, Christoph Grunau, Régis Fichot, Marie Mirouze, Franck Brignolas, Steeve Strauss, Stéphane Maury

Filière D

PD52- Analysis of lipid profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry in bovine ovarian follicle

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

PD53- Synchronous birth is a dominant pattern in receptor-ligand evolution

Anna Grandchamp, Alexandra Louis, Hugues Roest Crolius and Philippe Monget

PD54- Targeting the orphan receptor GPR88 by nanobodies (VHH) in order to modulate striatal opioid signaling

Thibaut Laboute, Lucie P Pellissier, Jorge Gandía, Yannick Corde, Julie Le Merrer, Jérôme AJ Becker

PD55- Résolution des conflits entre femelles de parasitoïdes: que la plus motivée gagne!

Anthony G.E. Mathiron, Patrice Pottier, Marlène Goubault

PD56- Etude de la dynamique de signalisation de la chémérine dans les cellules de granulosa humaines

Namya Mellouk, Christelle Ramé, Joëlle Dupont

PD57- Perception émotionnelle : influence de l'état affectif

Marion Rochet, Lise Dreyfuss, Wissam El-Hage, Borianna Atanasova

PD58- Implication du récepteur P2X7 dans un modèle murin de dépression

Troubat Romain, Pinchaud Katleen, Leman Samuel, Camus Vincent

Posters de participants hors filière

P59- Synthesis of triethylenetetramine N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic acid ligand for the formation of lanthanide complexes that absorb and emit in the near-infrared

Nicolas Chopin, Régis Delatouche, Ivana Martinic, Sylvain Routier, Svetlana V. Eliseeva, Stéphane Petoud, Franck Suzenet

P60- Design and synthesis of novel quinoxaline-2-carboxylic acids and analogues as Pim-1 inhibitors

Bruno Oyallon, Marie Brachet, Pascal Bonnet, Blandine Baratte, Thomas Robert, Sandrine Ruchaud, Stéphane Bach, Pascal Berthelot, Fabrice Gouilleux, Marie-Claude Viaud-Massuard, Caroline Denevault-Sabourin

P61- Inhibiting LIM Kinase: A possible treatment for neurofibromatosis type 1?

Anthony Champiré, Karen Plé, Hélène Bénédicti, Sylvain Routier

POSTERS

Délivrance de siRNA à l'aide de nanovecteurs magnétiques dans des cellules du cancer du sein triple négatif

S. Ben Djemaa¹, E. Allard-Vannier¹, K. Hervé-Aubert¹, J. Bruniaux¹, L. Lajoie², A. Falanga³, S. Galdiero³, I. Hourpa¹, E. Munnier¹, S. David¹

¹ EA6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Université François Rabelais – Tours, France

² UMR7292 CNRS 'Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer', Equipe 1, Université François Rabelais – Tours, France

³ Department of Pharmacy, CIRPEB - University of Naples "Federico II", Via Mezzocannone 16, 80134, Napoli, Italy

Une stratégie de thérapie ciblée pour le cancer du sein triple négatif pourrait être l'administration de petits ARN interférents (siRNA) pour inhiber spécifiquement l'expression de protéines surexprimées lors du processus tumoral. Néanmoins, la sensibilité des siRNA à la dégradation et leur difficulté à franchir les barrières cellulaires nécessitent le développement d'un système de délivrance. Dans cette optique, nous développons des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pégylées conjuguées à un peptide membranotrope ou CPP (gH625) facilitant l'internalisation des nanovecteurs. A ces SPION-PEG-gH625 sont ensuite ajoutés des siRNA et des polymères cationiques par assemblage électrostatique pour formuler les CS-MSN (CPP-stealth magnetic siRNA nanovectors). Lorsque les nanovecteurs sont fonctionnalisés par le gH625, l'inhibition de la GFP est comparable à celle d'un agent de transfection commercial mais significativement différente comparée aux vecteurs sans CPP, tout en restant non cytotoxiques sur les cellules. Le trafic intracellulaire des nanovecteurs avec et sans gH625 est à l'étude en quantifiant la colocalisation des nanovecteurs avec les compartiments intracellulaires à l'aide d'un imageur en flux. Le potentiel thérapeutique des CS-MSN est en cours d'évaluation en vérifiant l'induction de l'apoptose après ciblage de la protéine Bcl-xL.

Induction of stilbenoid metabolism in grape wood stored as freshly-pruned byproduct

Kévin Billet^a, Sébastien Besseau^a, Céline Mélin^a, Audrey Oudin^a, Gaëlle Glévarec^a, Vincent Courdavault^a, Marc Clastre^a, Nathalie Giglioli-Guivarc'h^a, Arnaud Lanoue^a

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

b Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Angers, France,

c Institut Français de la Vigne et du Vin, Tours, F-37400 Amboise, France

d University of Essex, Department of Biological Sciences, Wivenhoe Park, Clochester, United Kingdom

Grape canes are polyphenolic-rich vineyard by-products with valuable biological properties. However the stabilization of the raw material in an industrial perspective remains challenging. We reported the induction of stilbenoid metabolism after winter pruning including a strong accumulation of *E*-resveratrol and *E*-piceatannol during the first six weeks of storage. In the present study, the effect of mechanical wounding on freshly-pruned canes was tested to increase the induction of stilbenoid metabolism. Cutting the grape canes in short segments immediately after pruning triggered a transient expression of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and stilbene synthase (*STS*) genes followed by a rapid accumulation of *E*-resveratrol and *E*-piceatannol. The present process of freshly-pruned canes drastically shortens the time required to reach up maximal stilbenoid accumulation from 6 to 2 weeks.

Topic : Biological material stabilization

Mots-clés : stilbenoids, grape cane, postharvest storage, stilbene synthase

Détection de variations structurales déséquilibrées potentiellement délétères chez des patients autistes au sein d'une population Moyen-orientale

Tania Bitar^{1, 2}, Sandrine Vonwill¹, Sylviane Marouillat¹, Walid Hleihel², Christian R. Andres^{1,3}

¹Université François Rabelais, INSERM U930, Equipe neurogénétique et neurométabolomique, Tours France,

²Faculté des Sciences, Université Saint Esprit de Kaslik, BP 446 Jounieh, Liban,

³CHRU de Tours, laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, France.

Les Troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux caractérisés par des déficits au niveau de la communication, des interactions sociales et des comportements restreints et répétitifs. À ce jour, plus de 300 gènes candidats ont été caractérisés soit par des variations du nombre de copies (CNV) et/ou des variations nucléotidiques (SNV). L'objectif de ce travail est de déterminer la contribution des variations génétiques dans le génome de 19 autistes Libanais grâce aux approches d'Hybridation Génomique Comparative sur puce (CGH) et de PCR quantitative (qPCR). Nous avons utilisé une puce ayant une haute résolution fournie par Agilent Technologies contenant 400 000 sondes oligonucléotidiques [SurePrint G3 Human CGH microarray 2x400K] et permettant la détection de remaniements jusqu'à environ 5 Kb. Un total de 60 CNV candidats a pu être établi sur la base de nos critères de sélection. La vérification par qPCR a abouti à la validation de 18 d'entre eux. Nous avons observé 4 CNV de novo impliquant une délétion de 95Kb au niveau de la région 22q13.33, une duplication au niveau de la région 21q11.2-q22.2 impliquant le gène *SOD1*, une duplication au niveau de la région 5q21.3 et une délétion au niveau de la région 16p31.1. Les autres CNV candidats possèdent un statut hérité. Parmi les remaniements d'intérêt, nous avons détecté une duplication de 1.7 Mb impliquant le gène *PPP2R3B*, une duplication au niveau de la région 3p26.3 impliquant le gène *CHL1* connu pour son rôle majeur dans l'établissement des synapses du cerveau. Nous avons détecté une délétion de 3.5 Mb au niveau de la région 18q23 impliquant le gène *MBP* codant une protéine qui est le constituant majeur de la gaine de myéline des oligodendrocytes et des cellules de Schwann dans le système nerveux. Ces résultats peuvent conduire à une amélioration du diagnostic des TSA et à des cibles thérapeutiques inexploitées applicables aux patients libanais ou non libanais.

Thème : Etude génétique

Mots-clés : CGH, CNV, Troubles du spectre autistique, autistes Libanais.

Actes du 30^{ème} Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 12-13 Octobre 2017

Topical phage therapy efficiently treats acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice

Bodier-Montagutelli E.^{1,2,3}, Dalloneau E^{1,2}, Pallaoro N.^{1,2}, Fevre C.⁴, Morello E.^{1,2}, Respaud R.^{1,2,3}, L'Hostis G.⁴, Gabard J.⁴, Vecellio L.^{1,2,5}, Heuzé-Vourc'h N.^{1,2}

1 - Université François Rabelais, UMR 1100, 37032 Tours, France

2 - INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR1100, 37032, Tours, France

3 - CHRU de Tours, Service de Pharmacie, 37032 Tours, France

4 - Pherecydes Pharma, 93230 Romainville, France

5 - DTF-Aerodrug, 42003 Saint-Etienne, France

Introduction: Evolving antibiotic resistance makes *Pseudomonas aeruginosa* (*Psa*) lung infections increasingly difficult to treat; bacteriophages (phages) are part of the foreseen complementary/alternative therapies. In this study, we assessed the preclinical efficacy of a phage cocktail delivered through the airways.

Materials and Methods: Lung infection was obtained by pulmonary inoculation of bioluminescent *Psa* to Balb/c mice. Two hours post-infection (p.i.), a cocktail of 9 *Psa*-targeting phages was delivered by intravenous (IV) or pulmonary route, at Multiplicities Of Infection (MOI) of 0.1; 1 and 10. The infection was monitored by bioluminescence, survival, and lung/blood bacteria and phage counts at various time points. Phage efficacy was compared to amikacin's.

Results: Pulmonary rather than IV phage administration resulted in a significant decline of lung infection, and reduced the 24h-mortality. The dose-response study demonstrated the best 48h-efficacy for MOI 10 – equal but delayed vs IV or pulmonary amikacin. After inhalation, the early increase of pulmonary phage load explained by phage replication in the presence of their host, is followed by a gradual decrease. Phage therapy also allowed a rapid decline of pulmonary bacterial load, which was undetectable at 96h p.i.

Conclusion: A unique pulmonary administration allowed phage replication at the infection site, dramatically reducing lung bacterial load and mortality, comparably to a reference antibiotic.

Thème : Infectiologie, pathologies respiratoires

Mots-clés : Infections respiratoires, phagothérapie, bactériophages, *Pseudomonas aeruginosa*, modèle animal

Evaluation d'un nouvel inhibiteur ciblant STAT5 dans les cellules leucémiques

Marie Brachet-Botineau^{1,2}, Ludovic Juen³, Jérôme Bourgeois^{1,2}, Véronique Maguer-Satta⁴, Marie-Claude Viaud-Massuard³, Gildas Prié³, Olivier Hérault^{1,2}, Fabrice Gouilleux¹

(1) Equipe LNOx, UMR 7292 CNRS, Faculté de Médecine, Bâtiment Dutrochet - 10bis bd Tonnellé - 37032 TOURS.

(2) CHRU de Tours - Service d'Hématologie Biologique - 2 boulevard Tonnellé - 37044 Tours - France

(3) Equipe IMT, UMR 7292 CNRS, Université de Tours, Labex SYNORG, Faculté de Pharmacie - 31 avenue Monge - 37200 TOURS.

(4) Centre Leon Berard, CRC, U1052 UMR 5286, Université Claude Bernard - 28 rue Laennec - 69008 LYON

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif dû à la translocation t(9 ;22) qui donne naissance au gène de fusion BCR-ABL. Cet oncogène code pour une tyrosine kinase Bcr-Abl qui active de nombreuses voies de signalisation parmi lesquelles STAT5A et STAT5B (Signal Transducers and Activators of Transcription 5A/5B). L'Imatinib est un inhibiteur de Bcr-Abl utilisé dans le traitement des LMC. Son efficacité est cependant limitée puisqu'on dénombre 15% d'échec à cette thérapeutique en raison, en partie de la présence persistante de cellules souches leucémiques résistantes au traitement. STAT5 étant un effecteur clé de Bcr-Abl, l'inhibition de la voie STAT5 est donc une cible de choix en chimiothérapie pour diminuer la survie et l'autorenouveaulement des cellules souches leucémiques. Nos premiers travaux (Juen *et al*, 2017) ont permis d'identifier un composé capable d'inhiber STAT5 et présentant des effets proapoptotiques et antiprolifératifs prometteurs sur des lignées de LMC mais également sur des lignées de Leucémies Myéloïdes Aigues (LAM) exprimant une forme active de STAT5.

Des recherches plus récentes ont permis de montrer que ce composé ne présente pas d'effet cytotoxique sur des lignées normales, comme les cellules stromales. En revanche, elle semble être capable de stimuler l'effet antileucémique de l'Imatinib sur des lignées de LMC et de lever la résistance à l'Imatinib sur des lignées résistantes à ce traitement. Cette levée de la résistance est également observée sur des lignées de LAM rendues résistantes à la Cytarabine.

De nombreuses pistes sont explorées afin de comprendre précisément le mécanisme d'action du composé responsable de cette levée de résistance. Ses effets sur la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et sur la quiescence seront particulièrement investigués

Mots Clés : LMC LAM, STAT5, Imatinib, Chimiorésistance

Lack of FcRn induced impairment of NK cell functions in the tumor microenvironment

Diana Cadena Castaneda¹, Christine Dhommée¹, Thomas Baranek², Emilie Dalloneau², Laurie Lajoie^{1,3}, Nathalie Heuzé-Vourc'h^{2*} and Valérie Gouilleux-Gruart ^{1,3*}

*1 Université François Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France. 2 Université François Rabelais, INSERM UMR1100, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Tours, France. 3 Laboratoire d'immunologie, CHRU de TOURS, Tours, France. * These authors contributed equally in the design of this project.*

The FcRn, is the protein responsible for the homeostasis of albumin, recycling and transcytosis of IgG (Roopenian et al. *Nat. Rev. Immunol* 2007). Recently, several articles have reported the contribution of FcRn in the anti-tumor immune response by showing that its expression was modulated in pathological conditions, notably in lung cancer (Baker et al. *Immunity* 2013; Dalloneau et al. *Oncotarget* 2016). The FcRn deregulation in tumors and its consequences on the anti-tumor immune response are not clearly identified.

The objective of our work was to study the influence of the FcRn expression on the immune response. For this purpose, wild-type and FcRn knock-out (FcRn^{-/-}) mice were inoculated with intravenous melanoma (B16F10) cells leading to the development of pulmonary tumors (Overwijk and Restif. *Curr Protoc Immunol* 2001). Our results showed that tumorigenesis was amplified in FcRn^{-/-} mice and it was associated with an abnormal NK cell profile.

The results obtained in this model support the notion that FcRn expression in the tumor microenvironment plays a role in anti-tumor immunity via NK cell maturation and activation.

Theme: Oncoimmunology

Keywords: FcRn, anti-tumor response, NK cells, IFN- γ

Protéolyse de la région charnière des immunoglobulines G et conséquences fonctionnelles : Application aux anticorps thérapeutiques

Quentin Deveuve¹, Laurie Lajoie¹, Valérie Gouilleux-Gruart^{1,2}, Gilles Thibault^{1,2}

1 CNRS, GICC UMR 7292, LabEX MAbImprove Université François-Rabelais de Tours, Tours, France
2 Laboratoire d'Immunologie, CHRU de Tours, Tours, France

Les anticorps thérapeutiques, ayant pour la plupart une structure d'immunoglobulines G (IgG), sont une avancée majeure dans le traitement de nombreuses pathologies cancéreuses et inflammatoires. Des mécanismes de résistance à ces traitements apparaissent cependant chez de nombreux patients.

Il a récemment été proposé que les IgGs endogènes de sujets sains ou atteints de ces pathologies peuvent être clivées au niveau de leur région charnière. Cette région est impliquée dans la liaison des IgGs aux récepteurs Fc, déclencheur des fonctions effectrices de plusieurs cellules immunitaires telles que les cellules NK ou les macrophages. Le clivage entraîne ainsi une diminution de l'affinité des IgGs pour ces récepteurs et donc une diminution des réponses effectrices.

Dans ce travail de thèse, nous cherchons à évaluer la susceptibilité des différents formats d'anticorps thérapeutiques ou non vis-à-vis du clivage par les protéases présentes dans les microenvironnements pathologiques. L'utilisation de protéases, particulièrement les metalloprotéinases retrouvées très largement dans le microenvironnement tumoral ou inflammatoire chronique, met en évidence une susceptibilité variable des anticorps à celles-ci. L'utilisation des formes clivées d'anticorps montre que leur fixation au récepteur membranaire FcγRIIIa, exprimé sur les cellules NK et responsable du phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, est très fortement diminuée. La liaison de ces formes clivées au récepteur FcRn (récepteur Fc néonatal), responsable entre autre du recyclage et de la biodistribution des IgGs, est également en cours d'étude et devrait apporter des données supplémentaires sur la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques.

Thème : Immunologie

Mots-clés : Anticorps thérapeutiques, protéolyse, MMP, récepteurs Fc, FcRn

Mise au point d'un modèle *in vitro* d'étude de la niche leucémique

Margaux Deynoux, Nicola Sunter et Frédéric Mazurier
Université François-Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France

Le microenvironnement médullaire constitue une niche qui protège et permet le développement des cellules leucémiques. La moelle osseuse (MO) normale et leucémique est faiblement oxygénée (hypoxie). Par ailleurs, l'hypoxie influence la prolifération des cellules cancéreuses, la différenciation et la chimiorésistance. Nous cherchons à comprendre si l'hypoxie est un facteur majeur du microenvironnement dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Pour modéliser la niche leucémique, nous avons développé un modèle *in vitro* de culture de cellules de LAM avec des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) de MO. Nous avons ainsi mis en évidence trois populations de cellules leucémiques : non-adhérentes, adhérentes et nichées dans la couche de CSM. Les cellules nichées ont une faible prolifération et une très forte résistance à la cytarabine (>50%), par rapport aux cellules non adhérentes et adhérentes (<10%). Ceci démontre que le surnageant ou le seul contact avec les CSM ne sont pas suffisants à la chimiorésistance comme suggéré auparavant. Nous observons également que ces cellules ont un faible métabolisme oxydatif, en utilisant des sondes fluorescentes (DCF-DA, MitoSOX) sensibles aux différentes espèces réactives de l'oxygène. Des travaux de la littérature sur les cellules souches hématopoïétiques normales montrent que les cellules nichées acquièrent un profil hypoxique. Nous cherchons actuellement à démontrer la formation d'une hypoxie dans les cocultures et à mettre en évidence un lien entre hypoxie et métabolisme oxydatif, d'une part, et la chimiorésistance, d'autre part. Nous sommes intéressés par comprendre comment sont exprimés les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) dans les cellules de LAM et les CSM, et s'ils participent à la régulation des gènes antioxydants et à la chimiorésistance. Pour cela nous utiliserons des inhibiteurs pharmacologiques connus pour bloquer HIF et la prolifération leucémique, ainsi qu'une stratégie shARN pour cibler HIF dans les cellules leucémiques et/ou dans les CSM. Enfin pour aller plus loin, nous avons développé une niche 3D avec les CSM et mis en évidence une modulation des HIF et des gènes antioxydants. Elle pourra à terme être colonisée par les cellules de LAM. Ces travaux devraient participer à mieux comprendre les mécanismes par lesquels le microenvironnement et l'hypoxie agissent sur la leucémogénèse afin d'améliorer les traitements des LAM.

Mots-clés : Hypoxie, métabolisme oxydatif, leucémie aiguë myéloïde, microenvironnement

SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIAL ENERGY METABOLISM IN CANCER CACHEXIA: CLINICAL AND MECHANISTIC APPROACHES

Dolly A¹, Cournet J¹, Dumas JF¹, Servais S¹

¹INSERM UMR1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", University of François Rabelais, Tours, France.

Background: Cancer-associated cachexia is a wasting disorder caused by negative energy balance, which dramatically diminishes quality of life and survival and is linked to poor responses to chemotherapy. One important feature of cachexia is the progressive loss of skeletal muscle mass. Despite growing interest and knowledge, there are still unexplored mechanistic pathways underlying cancer cachexia. Evidence from pre-clinical models of cancer cachexia and key works on muscle cells suggest proteolytic pathways, mitochondrial dysfunctions and sarcoplasmic reticulum stress to be important factors that could contribute to the development of skeletal muscle atrophy associated with cancer cachexia. However, no clinical studies on muscular mitochondrial bioenergetics have been performed yet.

Methods: A clinical pilot study (METERMUCADIG, NCT02573974) is including 45 patients with pancreatic or colorectal cancer and suffering from mild or severe cancer cachexia. Pectoral muscle biopsies and blood samples are collected before chemotherapy. Patients muscle mass is assessed by CT-Scan at the third lumbar vertebrae. We also use an *in vitro* model of mouse skeletal muscle cells, C2C12 for the mechanistic analyses of muscle atrophy.

Results: Our preliminary data on muscle biopsies seem to show a decrease of mitochondrial oxygen consumption linked to ATP synthesis (35%) in severe cachectic patients in comparison to mild cachectic patients. In addition, mitochondrial oxygen consumption related to energy wasting (30%) and to maximal respiratory capacity (25%) seems to be decreased in severe cachectic patients. This suggests a global reduction in mitochondrial bioenergetics in severe cachexia that can be explained by specific respiratory complex alteration and/or decrease in mitochondrial content. *In vitro*, we show that TNF α , a proinflammatory cytokine, induces an atrophy of differentiated C2C12 myotubes in a dose-dependent manner. Treating C2C12 with 125 ng/mL of TNF α for 48h resulted in a significant myotube atrophy by 32%, without affecting mortality.

Conclusion: Our data in skeletal muscle of severe cachectic patients seem to confirm mitochondrial bioenergetics alterations as described in murine models. Furthermore, our *in vitro* model of muscle atrophy will permit us to determine the links between muscle atrophy, mitochondrial energy metabolism and sarcoplasmic reticulum stress.

Thème : Mitochondria in cancer metabolism

Mots-clés : Cancer Cachexia, Muscle, Mitochondria

Régulation du canal SK3 par l'AlkylGlycerone Phosphate Synthase dans des cellules de cancer du sein

D. Fontaine, A.-M. Bouchet, M. Potier-Cartereau, P. Besson, M. Pinault, A. Chantôme, C. Vandier

INSERM UMR 1069 « Nutrition, Croissance et Cancer », Tours

Les éther-lipides sont des lipides abondants dans l'huile de foie de requin qui possèdent des propriétés anti-tumorales et diminuent les effets secondaires induits par la radiothérapie. Ces éther-lipides naturels possèdent une chaîne longue d'alcool gras liée au glycérol par une liaison éther et sont présents dans les membranes cellulaires, sous la forme d'alkyl-phospholipides ou d'alkényl-phospholipides. Ils sont retrouvés en plus grande quantité dans les tumeurs que les tissus non tumoraux et l'inhibition de leur synthèse réduit la migration de cellules cancéreuses. L'objectif de ce travail a été de déterminer si la suppression de l'AlkylGlycerone Phosphate Synthase (AGPS), une enzyme clé de la synthèse des éther-lipides, peut moduler l'expression et les fonctions biologiques du canal SK3, retrouvé anormalement exprimé dans des cellules épithéliales cancéreuses du sein, favorisant leur migration. Il a par ailleurs été décrit comme étant sensible à des éther-lipides naturels ou des analogues synthétiques. Ces travaux ont été réalisés sur une lignée de cancer du sein (MDA-MB-435s). Nous avons ainsi pu constater une diminution de l'ordre de 70% de la quantité d'éther-lipides dans les MDA-MB-435s après suppression de l'AGPS. Nous avons ensuite montré une diminution des ARNm codant pour SK3, de la migration et de l'influx calcique dépendant de ce canal probablement par modulation de l'expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3. Ces données montrent pour la première fois que les éther-lipides endogènes régulent l'expression du canal SK3 dans une lignée cellulaire cancéreuse.

Thème : cancérologie

Mots-clés : cancer du sein, éther-lipides, canal SK3, signalisation calcique

Molécules amphiphiles modulatrices du canal SK3, vers une nouvelle thérapie anti-métastatique ciblant le complexe ORAI1/SK3

S. Kouba^{1,2}, R. Felix^{1,2}, J. Braire³, A. Chantôme^{1,2}, J. Lebreton^{2,3}, C. Vandier^{1,2},
M. Mathé-Allainmat,^{2,3*} M. Potier-Cartereau^{1,2*}

¹ INSERM UMR 1069, Université de Tours, France, ² Ion channels Network and Cancer-Cancéropôle Grand Ouest, (IC-CGO)

³ CEISAM CNRS UMR 6230, Université de Nantes, France, * ont participé de manière équivalente à ce travail

Des études récentes développées au sein du laboratoire (INSERM UMR 1069-Tours) ont permis de mettre en évidence le rôle des canaux calciques Orai1 et des canaux potassiques activés par le calcium (SK3), sous forme de complexes, régulant l'homéostasie calcique non seulement dans la biologie de la cellule cancéreuse mais aussi lors du développement tumorale. C'est pourquoi l'identification de modulateurs de ces canaux, pour lesquels il n'existe à ce jour aucun bloqueur spécifique, constitue une opportunité unique pour explorer un nouveau concept thérapeutique ciblé original, et notamment pour lutter contre le développement des métastases osseuses. Parmi les molécules présentant une activité inhibitrice sur les canaux potassiques (SK), plusieurs composés de type hétérocyclique azoté neutres comme la 4-AP ou le AG525E1, ou chargés comme le composé NMAG525E1 ont antérieurement été identifiés. En collaboration avec une équipe de chimistes nantaise (Symbiose, CEISAM UMR CNRS 6230) et bénéficiant de notre expérience, une étude a été engagée au sein du réseau Canaux Ioniques-CGO, avec pour objectifs : 1) de développer une nouvelle famille de molécules azotées présentant des caractéristiques amphiphiles et 2) d'évaluer l'activité de ces nouveaux composés (ne présentant pas ou peu de toxicité) sur la migration dépendante du canal SK3 et la signalisation calcique des cellules cancéreuses du sein et de la prostate.

Thème : Molécules amphiphiles régulatrices de la progression tumorale dépendante du canal SK3.

Mots clés : Molécules amphiphiles, Canaux ioniques, Homéostasie calcique, Cancer

Molecular imaging coupled to advanced chemometrics methods for cosmetic bioactive compounds detection and tracking in complex biological matrices

L.Miloudi¹, F. Bonnier¹, A. Tfayli², I., F Yvergnaux³, I. Chourpa¹, E. Munnier¹

¹Université François-Rabelais de Tours, EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, 31 avenue Monge, Tours, France, ²Université Paris-Saclay, Laboratory of lipids: Analytical and Biological Systems Lip(Sys)2, France, ³Bioeurope, Anet, France

Cosmetic industry constantly develops more sophisticated active ingredients to improve the results of their products. Nevertheless, the biological assessment of the cutaneous penetration of these active molecules remains particularly limited with current analytical techniques available. Raman spectroscopy is a label-free and non-destructive characterization technique delivering specific molecular fingerprint. Recent advancement in the field of Raman Confocal Imaging (RCI) has further supported the potential of such methods for both industrial and research applications in the field of cosmetics. In the present work, a methodology for *in vitro* screening of newly identified Active Cosmetic Ingredient (ACI) and/or newly developed formulations is proposed as the next generation objectivation tool. Facing the complexity of the data set collected, innovative statistical approaches are being explored to deliver accurate chemical images. As a model, the Delipidol® (slimming agent) has been applied on reconstructed human skin (Episkin) in order to monitor its penetration through the epidermis. Processing the Raman spectra with the NCLS (Non Negative Least Squares) algorithm allows to generate distribution maps of the ACI and construct penetration profile to quantify the ACI in the different skin layers.

Topic: Spectral imaging of biological tissue

Keywords Skin, Active cosmetic ingredients, Raman Confocal imaging, Data analysis

Funding: ARD-2020 Cosmétosciences (2015-00103497)

Quantitative analysis of in complex formulation using FTIR-ATR and Raman spectroscopy

L. Miloudi*¹, F. Bonnier¹, D. Bertrand², Xavier Perse¹, I. Chourpa¹, E. Munnier¹

¹ Université François-Rabelais de Tours, Faculté de Pharmacie, EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

²Data_Frame, 25 rue Stendhal, 44300 Nantes, France

The advent of nanotechnologies has raised new concerns about physicochemical characterisation of pharmaceutical and cosmetic products. Notably, quantification of encapsulated active ingredients can be a fastidious requiring destructive and time consuming approaches such as liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Using recent advancements in cosmetic formulation based on alginate nanocapsules (ANC) the potential of infrared and Raman spectroscopy as non-destructive, direct and reliable quantitative approach has been highlighted. A comparative study conducted on curcumin loaded ANC has clearly demonstrated a) the suitability of the techniques for analysis of viscous samples (gels) without prior preparation steps and b) their complementary towards the chemical information gleaned from the samples. Therefore, after optimisation of advanced multivariate methods such as PLS-R (Partial Least Square Regression), it appears infrared spectroscopy is particularly sensible for quantifying the encapsulation system itself (concentration of ANC) while Raman spectroscopy is rather specific to the AI loaded inside the nanocapsules (concentration of curcumin). Our study suggests that coupling of both techniques would be optimal for industrial applications as quality control tools (Miloudi *et al*, ABC, 2017).

Topic: Analytical techniques for quantitative analysis

Keywords: encapsulation, cosmetic product, optical spectroscopy, quantitative analysis

Funding: ARD-2020 Cosmétosciences (2015-00103497)

Expression and role of pore-forming and auxiliary subunits of voltage-gated sodium channels (Nav) in pH regulation and invasive properties of human colorectal cancer cells

Lucile Poisson¹, Frédéric Gradek¹, Lucie Brisson¹, Emeline Bon¹, Stéphan Chevalier¹, Sébastien Roger¹, Pierre Besson¹ and Driffa Moussata^{1,2}

¹ Inserm UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer, Faculté de Médecine de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France

², Service d'hépatogastroentérologie et de cancérologie digestive, hôpital Trousseau, CHRU de Tours, 37000 Tours, France

Colorectal cancer (CRC) is a major cause of morbidity and mortality throughout the world, affecting men and women almost equally. Increasing evidence suggests that ion channels, and more specifically voltage-gated sodium channels (Nav) are key contributors to the oncogenic behaviour of cancer cells. In breast cancer, we have previously demonstrated that the isoform Nav1.5 is abnormally expressed *de novo* in tumours and cancer cells, in comparison to non-cancer tissues where it is absent. Nav1.5 contributes to the invasive potential of breast cancer cells by acidifying the extracellular pH through the allosteric activation of the Na⁺-H⁺ exchanger type 1 (NHE1), known to be overexpressed in cancers, and the subsequent activation of extracellular matrix-remodelling proteases. In colon cancer cells, Nav1.5 was shown to be expressed at the luminal side plasma membrane and its activity contributed to the invasive potential of colon cancer cells.

In this study, we assessed the expression levels of pore-forming α - and auxiliary β -subunits of Nav in different human colorectal cancer cell lines and colon or rectal cancer patient's biopsies. In all cell lines tested, transcripts of Nav1.5 and Nav1.6 were the more abundantly expressed pore-forming isoforms. The mRNA encoding for the β 1 subunit was the most expressed among all regulatory β subunits. Concerning biopsies, a trend to an overexpression of the isoforms Nav1.2, Nav1.4 and Nav1.5 was observed in the rectal cancer samples compared to the matched non-cancerous tissues. The expression of β 3 appears increased in the rectum and decreased in the colon. Nav α -subunit functionality was confirmed in SW620 and SW480 cancer cell lines by the recording, using the patch clamp technique, of TTX-inhibited sodium currents. The use of specific pharmacological inhibitors, allowed us to consider the possible involvement of Nav channels and NHE in the regulation of the intracellular pH in SW620 cells, as in breast cancer cells. Mechanistic studies will be necessary to explain the involvement of Nav/NHE in the development of colorectal cancer.

Theme: colorectal cancer

Keywords: colorectal cancer, cell lines, voltage-gated Na⁺ channels (Nav), expression, functionality..

Méthylation des cellules souches/stromales mésenchymateuses dans la niche leucémique

ROUX B.¹, PICOU F.¹, HALTY C.¹, VIGNON C.¹, HANNA J.^{1,2}, FOUCAULT A.², DOMENECH J.^{1,2}, HERAULT O.^{1,2}

1 CNRS - Université François Rabelais Tours, UMR 7292 GICC, Equipe 2 LNOx
2 CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Bretonneau

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont un constituant essentiel de la niche hématopoïétique. Lors des leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les CSM sont perturbées par le contact avec les cellules leucémiques. Notre objectif est de découvrir si cela affecte la méthylation de l'ADN des CSM (celle-ci étant perturbée dans les cellules leucémiques) et quels sont les mécanismes en cause.

Sur des CSM de donneurs sains et leucémiques (au diagnostic), nous avons étudié le niveau global de méthylation des CSM et le niveau d'expression de gènes codant des enzymes clés dans la méthylation de l'ADN. La niche a été modélisée *in vitro* par un système de coculture de cellules KG-1a placées au contact de CSM saines. La méthylation globale de l'ADN de ces CSM a été mesurée par une technique de Dot Blots (immunomarquage des 5-mC sur nitrocellulose) et par des puces de détection de la méthylation (Illumina Infinium®). L'expression des ARNm codant les enzymes d'intérêt a été étudiée dans des CSM saines et leucémiques (cultivées seules) par RT-qPCR (Roche LightCycler®).

Les deux techniques d'étude de la méthylation de l'ADN ont révélé une hyperméthylation globale des CSM après contact avec les cellules leucémiques. L'étude transcriptomique a mis en évidence des gènes critiques surexprimés (MBD4, TET3) ou sous-exprimés (DNMT1, DNMT3B, IDH2, UHRF1) dans les CSM de patients leucémiques

Cathepsin C inactivation impairs membrane expression of proteinase 3, the ANCA antigen in granulomatosis with polyangiitis

Seda SEREN^{1,2}, Sandrine DALLET-CHOISY^{1,2}, Francis GAUTHIER^{1,2}, Sylvain MARCHAND-ADAM^{1,2} and Brice KORKMAZ^{1,2}.

1 INSERM U-1100 « Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires », Tours, France

2 Université François Rabelais, Tours, France

Proteinase 3 (PR3) is one of the four neutrophil serine proteases activated by lysosomal cysteine peptidase cathepsin C (CatC) during neutrophil maturation and stored within the intracellular granules. Membrane-bound PR3 is the main target antigen of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in granulomatosis with polyangiitis (GPA), a systemic small-vessel vasculitis. The binding of ANCA to membrane PR3 triggers neutrophil activation with the secretion of PR3 and related proteases contributing to vascular damage. CatC deficiency in Papillon-Lefèvre syndrome (PLS) due to gene mutations results in a severe reduction in both proteolytic activity and amounts of PR3 in the peripheral blood neutrophils. In this work, we aimed to investigate the impact of CatC inactivation on membrane PR3 expression. Blood neutrophils from 18 PLS patients showed 0.5-4% of the PR3 activity of the healthy control cells despite the total inactivation of CatC suggesting that CatC is the major but not the unique activator of PR3. The membrane expression of PR3 on activated PLS neutrophils was diminished by ~80% compared to the controls cells as assessed by flow cytometry. Ten days treatment of the human CD34+ hematopoietic stem cells with a potent cell permeable nitrile CatC inhibitor during differentiation into neutrophils resulted in total abrogation of PR3 activity in cell lysates and also its membrane expression. CatC is an attractive therapeutic target to lower intracellular and membrane-bound PR3 in GPA patients.

Keywords: proteinase 3, cathepsin C, neutrophil, granulomatosis with polyangiitis, Papillon-Lefèvre syndrome

Rôle de protéines cibles dans le processus de biominéralisation de la coquille d'œuf de poule

Lilian STAPANE, Nathalie Le Roy, Jacky EZAGAL, Jean-Claude Poirier, Joël Gautron

Station de recherches avicoles, Institut national de la recherche agronomique, Centre de Tours, 37 380 Nouzilly, France

L'œuf de poule constitue une chambre aseptique et auto-suffisante pour permettre le développement extra-utérin de l'embryon. La formation de l'œuf suit un processus spatio-temporel bien précis permettant la mise en place des différents compartiments de l'œuf (jaune, blanc, membrane vitelline, membranes coquillières et coquille) le long de l'appareil reproducteur. La coquille d'œuf constitue la barrière physique de l'œuf contre la pénétration de pathogènes et les chocs mécaniques. Son intégrité est cruciale pour assurer la qualité hygiénique de cet ingrédient de base de la consommation humaine et pour permettre le développement harmonieux du poussin en cas de fécondation. La coquille est constituée à 95% d'une phase minérale de carbonate de calcium (CaCO_3 , sous forme de calcite) et à 3,5 % d'une phase organique (matrice organique, MO) principalement constituée de protéines et protéoglycanes. La formation de la coquille résulte d'un processus de biominéralisation contrôlée acellulaire dans l'utérus. Ce processus débute par un dépôt de carbonate de calcium amorphe (ACC) sur les membranes coquillières qui est suivi par une transformation de l'ACC en agrégat de calcite. Il y a ensuite la formation de colonne de cristaux de calcite ayant une orientation privilégiée qui suit l'axe-c, perpendiculaire à la surface des membranes coquillières. Finalement, l'arrêt de la calcification est marqué par le dépôt de la cuticule. Il a été démontré que la MO jouait un rôle fondamental dans la minéralisation de la coquille d'œuf (Nys et al., 1999, Gautron and Nys, 2007). En effet, la MO contrôle et stabilise les différentes phases minérales du CaCO_3 (ACC et calcite), favorise la nucléation des cristaux, leur croissance et détermine leur morphologie. Ces interactions MO-minéraux donnent à la coquille sa texture et ses propriétés mécaniques.

Mon projet de thèse vise à caractériser et à valider expérimentalement la fonction associée à la biominéralisation, de protéines de la MO surabondantes au cours des événements clés du processus de calcification de la coquille. Il s'agira donc d'établir un lien entre la solidité de la coquille, le niveau d'abondance des protéines et leur expression génique, à différents stades de la minéralisation ou selon divers facteurs physiologiques (âge, solidité de la coquille...).

Nous avons initié deux études sur des poules pondeuses Isa Brown pour lesquelles deux variables physiologiques ont été choisies : 1) le stade de biominéralisation de la coquille et 2) l'âge de la poule (la qualité de la coquille diminue avec l'âge). Afin d'établir un lien entre la solidité de la coquille, l'abondance des protéines cibles et l'expression des transcrits associés, trois approches sont en cours. Tout d'abord, des tests biophysiques (élasticité, résistance à la rupture...) sont utilisés pour mesurer la qualité de coquille en fonction de l'âge. En parallèle, l'expression différentielle des gènes codants pour ces protéines, à différents stades de la biominéralisation, est quantifiée par PCR en temps réel. Enfin, la purification de protéines candidates (MFGE8, EDIL3 et OCX21) est en cours dans le but de tester leur interaction avec le minéral. Cette interaction sera analysée par des tests de cristallisation *in vitro* couplés à de la microscopie électronique à balayage et de la spectroscopie infra-rouge (Université de Grenade, Espagne). A terme, ces protéines seront hiérarchisées par rapport au rôle prépondérant qu'elles jouent dans la détermination de l'ultrastructure de la coquille définissant ses propriétés mécaniques et des marqueurs génétiques de la qualité de coquille pourront être identifiés.

Thème : Production animale

Mots-clés : œuf, coquille, protéines, biominéralisation

Caractérisation des graines des mutants de prénylation chez *Arabidopsis*

Valentin VERGES, Kévin BILLET, Arnaud LANOUE, Michelle PINAULT, Cyrille GUIMARAES, Stéphane CHEVALIER, Eric DUCOS, Christelle DUTILLEUL et Nathalie GIGLIOLI-GUIVARC'H

EA 2106 Biomolécules et Biotechnologies Végétales – Université de Tours – France

La prénylation de protéine est une modification post-traductionnelle présente chez tous les eucaryotes. Elle consiste en l'ajout d'un lipide sur la cystéine d'un motif spécifique de l'extrémité C-terminale des protéines cibles. L'abolissement de la prénylation chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* n'est pas létal ce qui permet d'en étudier le rôle par génétique inverse. Parmi des effets pléiotropiques, l'équipe a montré que les plantes déficientes pour la prénylation produisent des graines plus lourdes et plus volumineuses. Une caractérisation morphologique et biochimique approfondie des graines de ces mutants révèle que les variations phénotypiques de ces graines s'accompagnent d'une modification de leurs contenus protéique, lipidique et en certains métabolites secondaires (flavonoïdes et glucosinolates). Ces observations suggèrent une large implication des protéines ciblées par la prénylation dans la maturation des graines, hypothèse qui sera étudiée dans le cadre du projet Oleopren (projet Région, 2017). *Arabidopsis* est une plante proche du colza et de la cameline, des oléagineuses cultivées pour l'huile contenue dans leurs graines. L'effet de l'absence de prénylation sur la maturation des graines présente donc un potentiel agronomique prometteur pour l'amélioration des espèces végétales cultivées.

Thème : physiologie végétale

Mots-clés : *Arabidopsis thaliana*, plantes oléagineuses, prénylation, graine, huile

A bradykinin-derived azapeptide as a potent inhibitor of cathepsin K

Mylène Wartenberg¹, Matthieu Galibert², Fabien Lecaille¹, Ahlame Saidi¹, Sylvie Mavel³, Alix Joulin-Giet¹, Brice Korkmaz¹, Dieter Brömme⁴, Vincent Aucagne², Agnès F. Delmas² & Gilles Lalmanach¹

¹ INSERM, UMR 1100, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Equipe "Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation", Université François Rabelais, Tours, France, ² CNRS UPR 4301, Centre de Biophysique Moléculaire, Equipe "Protéines de synthèse et chimie bioorthogonale", Orléans, France, ³ INSERM, UMR 930, Imagerie et Cerveau, Equipe "Neurogénétique et neurométabolomique", Université François Rabelais, Tours, France, ⁴ Department of Oral Biological and Medical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

Cathepsin K (CatK) is a bone-resorbing protease that is considered druggable for the treatment of osteoporosis and bone metastasis (1). A possible strategy for developing reversible and competitive inhibitors is to insert a non-cleavable bond at the P1-P1' position of a selective substrate. We chose bradykinin (BK) as framework, according to CatK may act as a kininase, a unique property among mammalian cysteine proteases (see for review: 2). Moreover CatK cleaves the BK-mimicking substrate Abz-BK-(3-NO₂-Tyr) more efficiently than angiotensin converting enzyme (3). Here we conserved the BK sequence and the fluorescence donor/acceptor pair (Abz/3-NO₂-Tyr) of the FRET parent substrate and we replaced the scissile P1-P1' bond by two different pseudo-peptide bonds. We introduced a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole bond that mimics partly the geometric, steric and electronic features of the *trans*-amide bond (4). Alternatively, we incorporated an azaGly bond by replacing the alpha carbon of the glycy residue at P1 by a nitrogen atom.

The triazolo-BK-derived molecule (MG2-16) was a somewhat weak inhibitor (K_i: μM range) of CatK. Conversely the azaGly-BK-derived peptide (MG2-17) inhibited powerfully CatK (K_i=9 nM) and impaired its kininase activity. Molecular docking studies supported that the azaGly bond of MG2-17 is more favorable than the 1,2,3-triazole linkage to preserve an effective affinity towards its target. Data support the proof of concept that the incorporation of an azaGly bond at P1-P1' is a possible strategy to develop potent, competitive and reversible inhibitors of various classes of proteolytic enzymes.

(1) F. Lecaille, D. Brömme, G. Lalmanach, Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90 (2008) 208–226

(2) F. Veillard, F. Lecaille, G. Lalmanach, Lung cysteine cathepsins: Intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1079–1094

(3) E. Godat, F. Lecaille, C. Desmazes, S. Duchêne, E. Weidauer, P. Saftig, D. Brömme, C. Vandier, G. Lalmanach, Cathepsin K: a cysteine protease with unique kinin-degrading properties, *Biochem. J.* 383 (2004) 501–506

Keywords: Cathepsin K, Cathepsin S, pseudo-peptidyl inhibitors, Triazolo-, AzaGly-substrate-like

Effet de concentrations élevées de [NaCl] sur l'orientation de la réponse immunitaire

Sally. Al-Hajj^{*1}, R. Lemoine¹, A. Goumard¹⁻², A. Héraud¹, P. Gatault¹⁻², M. Buchler¹⁻², C. Baron¹⁻², JM. Halimi¹⁻²

¹Université François Rabelais Faculté de Médecine, EA4245

²Service Néphrologie Immunologie clinique, Tours, France

Des concentrations élevées de NaCl favoriserait la polarisation lymphocytaire vers Th17 aggravant certaines maladies auto-immunitaires et accélérerait la survenue du rejet d'allogreffe cardiaque murine. Le rôle des Cellules Dendritiques dans cette polarisation n'est pas connu. Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer les effets de concentrations élevées de NaCl sur la morphologie, la maturation et la migration des CD puis leurs sécrétions de cytokines ainsi que son impact sur l'interaction CD-lymphocyte T CD4. Nous avons cultivés des CD dérivés de monocytes circulants stimulés 48 heures par du LPS soit à concentration suboptimale 2,5 ng/ml ou optimale à 50 ng/ml en présence de concentrations croissantes de NaCl. L'impact du NaCl a été évalué sur leur morphologie en microscopie électronique à balayage, leur survie, l'expression de leurs marqueurs de maturation et de migration en cytométrie en flux ainsi que leurs sécrétions de cytokines détectées dans leurs surnagants. La survie des CD et l'expression de CD (DC- SIGN) sont maintenues malgré de fortes concentrations de NaCl. Toutefois, nous avons observé des changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels des CD avec le sel. Une variabilité de réponse au sel sur la maturation a été constatée avec une tendance à l'inhibition de l'expression du marqueur CD83. Par ailleurs, l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 observée avec l'apport en sel suggère une faible capacité activatrice Th1. L'allongement des CD et la baisse de CCR7 observés indiqueraient une moindre capacité migratrice vers les OLS. Avec ces résultats préliminaires, nous n'avons pas d'argument pour expliquer que la polarisation lymphocytaire vers Th17 induite par le sel est médié par les CD.

Thème : Immunologie et inflammation.

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

Rôle du neutrophile au cours du SDRA : Existence de sous-populations fonctionnellement distinctes ?

Florent CREUSAT, Youenn JOUAN, Thomas BARANEK, Mustapha SI-TAHAR et Christophe PAGET

INSERM U1100 : Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR)

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une pathologie respiratoire touchant environ 10% des patients en réanimation, avec une mortalité avoisinant les 40%. Ce syndrome se caractérise par une insuffisance respiratoire due à des dégâts tissulaires importants d'origine inflammatoire. Bien que les causes soient multiples, une grande majorité des patients développe un SDRA à la suite d'une pneumonie infectieuse. Il est important de noter que les patients qui décèdent des suites d'un SDRA ne présentent plus de signes cliniques d'infection, plaçant ainsi un défaut de régulation de l'inflammation au centre de la problématique de cette pathologie.

L'importance des polynucléaires neutrophiles dans ces processus physiopathologiques est reconnue depuis de nombreuses années. Toutefois, leur rôle dans la mise en place et le développement du SDRA reste encore mal compris, notamment dans les mécanismes d'immunorégulation de la réponse immunitaire innée. De plus, l'existence de sous-populations neutrophiliques pouvant présenter des fonctions différentes a récemment émergé dans la littérature, notamment dans le cancer ou les processus inflammatoires. Leur existence en contexte infectieux reste cependant à démontrer.

Même si les échantillons cliniques nous permettent d'aborder cette hypothèse de façon descriptive, le développement d'un modèle animal pertinent mimant les symptômes du SDRA semble nécessaire. Bien qu'il soit difficile de recréer la complexité d'un syndrome tel que le SDRA, notre modèle expérimental d'infection grippale retranscrit certains paramètres clés de la pathologie humaine. En effet, les animaux meurent d'une réponse inflammatoire exacerbée alors que le virus n'est plus détectable dans leur organisme. De façon intéressante, les données de la littérature semblent contradictoires quant au rôle des neutrophiles dans ce modèle (bénéfique vs délétère).

Ainsi, nous nous proposons de mieux comprendre en quoi et par quels moyens les neutrophiles présentent cette double identité de protecteur/ agresseur lors du SDRA. De plus, nos données préliminaires suggèrent, sur des bases phénotypiques, la présence de populations neutrophiliques distinctes et recrutées de façon différentielle au cours de l'infection grippale. Nos travaux visent donc à mieux comprendre le rôle respectif de ces populations et leurs fonctions associées, afin de resituer le neutrophile dans le développement du SDRA.

Vaccin innovant contre la néosporose combinant les antigènes complets et des adjuvants glycolipidiques de *Neospora* dans une plateforme nanoparticulaire

Débare H¹, Moiré N¹, Betbeder D², Carpentier R², Ducournau C¹, Héraut B¹, Acosta-Paguay YD³, Laakmann J-D⁴, Schmidt J⁴, Schwarz RT⁴, Dimier-Poisson I¹, Debierre-Grockiego F¹.

¹ISP, INRA, Université Tours, 37380, Nouzilly, France ; ²LIRIC, Université de Lille, France ; ³Université des Forces Armées, Quito, Equateur ; ⁴AG Parasitologie, Université de Marburg, Allemagne

Le développement de vaccins efficaces contre les parasites intracellulaires nécessite un large panel d'antigènes et leur présentation optimisée au système immunitaire par le choix de la voie d'immunisation et de l'adjuvant les plus appropriés. Notre équipe a montré qu'un vaccin nanoparticulaire composé de maltodextrine/phospholipides contenant tous les antigènes solubles de *Toxoplasma gondii* et administré par voie nasale protège à 70% contre la toxoplasmose congénitale chez la souris (Ducournau *et al.*, 2017). Mon projet de thèse consiste à appliquer cette stratégie vaccinale contre la néosporose, l'une des principales causes d'avortements d'origine infectieuse chez les bovins. Pour cela, les antigènes solubles de *Neospora caninum* ont été incorporés dans ces nanoparticules. A cela, des glycolipides de *N. caninum* ligands des Toll-Like Receptors, ont été ajoutés comme adjuvants en vue d'obtenir une vaccination stérilisante. L'immunogénicité de la plateforme vaccinale (antigènes solubles +/- glycolipides) a été analysée *in vitro* sur des cellules présentatrices d'antigènes pour déterminer les doses à administrer *in vivo* dans un modèle de néosporose congénitale murine. Les souris immunisées par voie nasale sont infectées par *N. caninum* à mi-gestation et l'efficacité du vaccin est déterminée par la diminution de la charge parasitaire de la descendance.

Thème : Vaccination anti-parasitaire

Mots-clés : vaccin nanoparticulaires, Apicomplexes, *Neospora caninum*

Influence de l'Apolipoprotéine E sur le repliement des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C

Julie Dreneau, Anne Bull, Elodie Beaumont, Philippe Roingear, Audrey Boyer* and Jean-Christophe Meunier*

INSERM U966, Université François Rabelais and CHRU de Tours, Tours, France

* Les auteurs ont contribué de manière égale au projet.

Chez les patients infectés chroniquement par le virus de l'hépatite C (VHC), les particules virales circulent dans le sang sous forme de LipoViro Particules (LVP), particules hybrides associant des composants d'origine virales (ARN, protéine de capsid et d'enveloppe) et cellulaires (lipoprotéines, apolipoprotéine B et E (ApoB, ApoE). Les protéines d'enveloppe du VHC E1E2 s'associent précocement avec l'ApoE cellulaire, par des interactions protéine-protéine. Cette association est responsable de l'initiation de la morphogénèse des LVPs. De plus, nos résultats préliminaires indiquent que l'ApoE semble également influencer le repliement des glycoprotéines d'enveloppe. L'ApoE semble donc être un élément central dans la morphogénèse du VHC.

Afin de confirmer nos résultats préliminaires, les protéines E1E2 ont été exprimées en HEK293T co-transfectées avec des quantités croissantes d'ApoE. Lorsque les lysats cellulaires correspondants ont été soumis à des tests d'immunoprécipitation (Ip) utilisant des anticorps conformationnels ciblant E2 ou le complexe E1E2 (AR3A, AR5A), nous avons observé une augmentation de l'efficacité d'Ip d'E1E2 qui était en corrélation avec la quantité d'ApoE co-transfectée. Cette amélioration de repliement d'E1E2 était particulièrement évidente lorsque les résultats des Ip ont été examinés en Western Blot (WB) en condition non réductrice. Ainsi, ApoE semble faciliter la production de la forme native des protéines E1 E2.

De plus, nous examinons cette facilitation dans le système d'étude du VHC en culture cellulaire (HCVcc, génotype 2a, souche JFH-1). Nous avons en premier lieu modifié ces cellules pour leur faire exprimer des quantités décroissantes d'ApoE (shRNA ApoE). Celles-ci ont été inoculées via des particules rétrovirales afin d'y exprimer un shRNA ApoE (+ shRNA contrôle). Les cellules ont ensuite été sélectionnées avec une quantité croissante de puromycine (de 2 à 15 µg/mL) afin d'obtenir une gamme croissante d'inhibition d'ApoE. Nous avons observé en Western Blot, une inhibition d'ApoE de 20 à 50 % lorsque nous augmentons la quantité de sélection en puromycine. Les premiers résultats d'infectivité semblent montrer une corrélation entre l'inhibition d'ApoE et la diminution du pourcentage d'infectivité du VHC.

Maintenant, nous prévoyons de déterminer l'influence de l'inhibition progressive de l'expression d'ApoE en réalisant des co-IP d'E1E2-ApoE (WB en conditions réductrices et non-réductrices) ainsi qu'en déterminant l'efficacité de production de particules virales dans la cellule et dans le surnageant (ARN et infectivité). De plus, nous déterminerons l'évolution de la structure et de la taille moyenne des HCVcc JFH-1 en microscopie électronique. Au-delà de la complexité de l'interaction ApoE-E1E2, la démonstration selon laquelle ApoE semble agir comme chaperon pour les protéines d'enveloppe du VHC ouvre de nouvelles perspectives d'investigation sur l'interaction HCV-hôte.

Prior exposure to type I interferon boosts inflammation and bacterial uptake in chicken macrophages

Damien Garrido¹, Nathalie Chanteloup¹, Adrien Lion¹, Bernd Kaspers², Sascha Trapp¹, Catherine Schouler¹, Rodrigo Guabiraba¹

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

² Institut for Animal Physiology, University of Munich, Germany

Type I interferons (IFNs) are largely produced during host immune response to viral infections. However, strong type I IFNs (α/β) antiviral response has been associated to increased susceptibility to bacterial superinfection in mammals. In poultry farms, low pathogenic avian influenza virus (LPAI) infection is characterized by a subclinical disease in which its occurrence and pathological consequences are greatly underestimated. Avian colibacillosis is caused by avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains and represents the most common bacterial infection in poultry. It remains elusive whether LPAI-derived type I IFNs production impacts chicken immune response to colibacillosis. Macrophages are tissue-resident phagocytes that respond to both viral and bacterial infections to provide efficient host-response and pathogen clearance. We therefore investigated the effects of type I IFNs on the outcome of bacterial challenge in chicken macrophages. Macrophages were pre-treated with chicken IFN α followed by *E.coli* LPS stimulation or APEC infection. IFN α pre-treatment boosted APEC infection- and LPS-induced ROS/NO production and *NOS2*, *IL1B*, and notably *IFNB* gene expression. Interestingly, neutralization of IFN β limited IFN α boost on bacterial-driven pro-inflammatory response. In addition, APEC invasion rate was increased in macrophages pre-treated with IFN α , although bacteria clearance was not enhanced. We therefore suggest that a type I IFNs enriched milieu would exacerbate chicken macrophages pro-inflammatory response to bacterial infection, partly through IFN β upregulation. Also, IFN α would favor bacterial uptake without promoting increased bacterial clearance, therefore sustaining an overall inflammatory state in virus-bacteria superinfection contexts in chickens.

Thème : Inflammation Mots-clés : chicken, interferon, macrophage, *E. coli*

Induction de sous-populations de cellules Dendritiques humaines Tolérogènes par des fragments d'anticorps

N. Kakwata-Deluce^{1,3}, L. Lamendour¹, Z. Lakhri², A. Nicolas¹, A. Di Tommaso², N. Aubrey², V. Chabot³, F. Déhaut^{1,3}, F. Velge-Roussel¹

¹ Université François-Rabelais de Tours, EA4245, Tours, France

² Université François-Rabelais de Tours, UMR INRA1282 Tours, France

³ EFS Centre Atlantique, Tours, France

Introduction et but de l'étude : L'induction de tolérance immune reste un challenge important dans le domaine de la transplantation d'organe. Les cellules Dendritiques (DCs), piliers de la réponse immunitaire, jouent un rôle crucial aussi bien dans l'induction d'une immunité spécifique que dans celle d'une tolérance immune. Chez l'homme, il existe au moins quatre types de DCs effectrices majeures, les DCs conventionnelles (cDC), les DCs Plasmacytoïdes (pDCs), les DCs inflammatoires (MoDCs) et les cellules de Langerhans (LCs). L'objectif du projet est de préparer différents sous-types de DCs (cDC, moDCs, pDC, moLCs) afin d'analyser leurs capacités à synthétiser de l'IL-10 et à s'orienter vers un profil pro **tolérogène** grâce au ciblage des PRRs avec des fragments d'anticorps.

Méthodes : La différenciation des moDCs et moLCs est faite à partir de monocytes CD14⁺ isolés des PBMCs, en présence des **cytokines** spécifiques. La purification des pDC est faite avec des billes anti-BDCA-2 à partir des PBMC. Pour chacun des types de **DCs**, un **anticorps bispécifique** ciblant les PRRs **est construit**. L'effet des bi-spécifiques sur les DCs est analysé au niveau phénotypique par l'expression des marqueurs de co-stimulation et de maturation (ILT3, ILT-4, ICOS-, PD1-L, CD83, CD86, HLA-DR, CD25) et la sécrétion des cytokines pro ou anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β , IL-12p70, IFN- γ/α).

Résultats : Les moLCs différenciées sont caractérisées par l'expression de la Langerine (**CD207**) et de CD1a. Les moDCs se caractérisent par l'expression de CD209 et une plus faible expression de CD1a et les pDCs par l'expression conjointe de CD123 et BDCA-2. Les anticorps **bispécifiques** induisent une forte synthèse d'**IL-10** et peu de cytokine pro-inflammatoires (**IL-12p70, d'IFN- γ ou IFN- α**) mais aussi une modulation des marqueurs de maturation (**CD83, CD25, CD86 et HLA-DR**). La modulation d'IL10 est différente entre les sous-types de DCs étudiés au niveau basal comme activé.

Conclusion : les différentes populations de DC étudiées pourraient jouer des rôles distincts dans l'induction de tolérance immune, parce qu'elles présentent des capacités variées, entre autres pour la synthèse d'IL-10. L'induction et la caractérisation de Lymphocytes T régulateurs par les DCs qui sont les marqueurs principaux d'une tolérance immune sont en cours d'analyse.

Modulation de la prolifération cellulaire par *Salmonella* Typhimurium

Julien Mambu^{1,2}, Emilie Barilleau^{1,2}, Michel Olivier^{1,2}, Yves Le Vern^{1,2}, Laetitia Fragnet-Trapp^{1,2}, Philippe Velge^{1,2}, Agnès Wiedemann^{1,2}

¹-INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France.

²-Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France.

Salmonella Typhimurium, agent responsable d'intoxications alimentaires fréquentes chez l'homme, a récemment été mis en cause dans l'apparition de dérèglements de la prolifération cellulaire après infection, pouvant conduire à la transformation cellulaire. Cependant, le facteur de virulence de *Salmonella* responsable est à ce jour méconnu. *Salmonella* Typhimurium exprime à sa surface une invasine (Rck), qui est capable d'interagir avec le récepteur de l'EGF (Epithelial Growth Factor) exprimé à la surface de la cellule cible. Sachant que les voies de signalisation activées par le récepteur de l'EGF conduisent à des réponses cellulaires telles que la prolifération-différentiation de la cellule, nous nous sommes donc intéressés à l'implication de l'interaction de Rck avec le récepteur de l'EGF dans la dérégulation de la prolifération cellulaire. A l'aide de différentes approches, nous avons pu mettre en évidence que l'invasion cellulaire induite par Rck module la prolifération des cellules infectées et augmente le nombre de cellules infectées en phase S du cycle cellulaire, phase de réplication de l'ADN. Cette augmentation pourrait s'expliquer par l'apparition de dommages dans l'ADN que nous avons observés dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de Rck dans le dérèglement de la prolifération cellulaire induite par *Salmonella* Typhimurium et apporte des données complémentaires sur le rôle de Rck dans la pathogénèse de cette bactérie. La modulation du cycle cellulaire au profit de la bactérie questionne sur les conséquences à long terme d'infections bactériennes répétées sur la stabilité des génomes eucaryotes.

Thème : Infectiologie

Mots clés : *Salmonella*, cycle cellulaire, prolifération cellulaire

Nouvelles approches phénotypiques pour l'exploration des échecs de traitement de l'hépatite B chronique

Julien Marlet¹, Clément Lier¹, Denys Brand¹, Catherine Gaudy-Graffin¹

¹ INSERM U966, CHRU Tours, Faculté de Médecine, Université François-Rabelais, 10 Bd Tonnellé 37000 Tours
(jul.marlet@gmail.com)

Le traitement de première intention de l'hépatite B chronique (VHB) repose sur l'entécavir ou le ténofovir, deux analogues nucléos(t)idiques, inhibiteurs de l'ADN polymérase virale à activité transcriptase inverse (ADNpol/RT). La résistance primaire à ces deux molécules est rare (<1%). En cas d'échec thérapeutique chez un patient observant (diminution insuffisante ou reprise de la répllication virale), une recherche de mutations de résistance peut être réalisée par simple séquençage de la polymérase virale. Lorsque le séquençage n'est pas contributif malgré une forte suspicion de résistance, il est possible de réaliser un test phénotypique de résistance en laboratoire spécialisé. Nous avons appliqué cette approche phénotypique à 9 patients en échec thérapeutique inexplicé à l'entécavir, en utilisant un virus VHB recombinant exprimant une polymérase clonée à partir des prélèvements cliniques. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une résistance du virus à l'entécavir pour 3 patients sur 9, confirmant l'apport du test phénotypique en seconde ligne après le séquençage. Trois nouvelles mutations potentiellement associées à la résistance ont été identifiées dans la polymérase de ces virus : L217R, M250L et N238T. Leur rôle dans la résistance est en cours d'étude par mutagenèse dirigée et modélisation moléculaire. Chez les patients restant en échec inexplicé, le test phénotypique sera élargi à l'étude du génome entier du VHB. En conclusion, ces tests phénotypiques ont toute leur place dans la prise en charge optimisée et personnalisée des patients infectés par le VHB pour une prévention efficace des complications hépatiques de l'infection par le VHB.

Implication des cellules de Paneth lors de l'infection néonatale par *Cryptosporidium parvum*

A.F.Nicolosi,

M.Marquis, F.Laurent, S.Lacroix-Lamande

Cryptosporidium parvum est un parasite protozoaire responsable d'une infection intestinale, la cryptosporidiose. Cette zoonose se traduit par de graves diarrhées touchant principalement les individus immunodéficients et les enfants de moins de 5 ans. Cette pathologie est responsable de lourdes pertes économiques dans les cheptels de ruminants puisqu'elle est la première cause de diarrhée néonatale chez le veau. Cette sensibilité accrue des nouveau-nés à l'infection pourrait s'expliquer par l'immaturation de leur système immunitaire intestinal, et notamment par la présence d'un faible nombre de cellules de Paneth. Ces cellules, localisées à la base des cryptes intestinales, produisent des peptides antimicrobiens (PAM) dont l'activité antimicrobienne sur divers pathogènes a d'ores et déjà été démontrée. Ainsi, l'hypothèse que nous avons formulée est que l'apparition des premières cellules de Paneth (4-6 jours chez le souriceau) et des peptides antimicrobiens qu'elles produisent, joueraient un rôle central dans la résolution de la phase aiguë de l'infection par le parasite.

Mes travaux de thèse ont donc pour objectif d'étudier l'implication des cellules de Paneth et des PAM qu'elles produisent au cours de l'infection grâce notamment à l'utilisation d'un modèle murin déficient pour ces cellules. Par ailleurs, des études histologiques seront réalisées pour déterminer l'effet de l'infection sur le développement, l'apoptose ou la dégranulation de ces cellules. Enfin, un modèle d'étude *ex vivo* via le développement de la culture d'organoïdes nous permettra une étude plus ciblée des cellules de Paneth.

ETUDE FONCTIONNELLE DU SYTEME CRISPR/CAS DE TYPE II-A DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE EN FONCTION DES LIGNEES PHYLOGENETIQUES

Adeline PASTUSZKA^{1,2,3}, Emilie CAMIADE^{1,2}, Clément LIER³, Laurent MEREGHETTI^{1,2,3}, Philippe LANOTTE^{1,2,3}

¹Université François Rabelais de Tours, UMR1282 ISP, Faculté de Médecine, Equipe Bactéries et risque materno-foetal, F-37032 Tours, France

²INRA, UMR1282 ISP, Equipe Bactéries et risque materno-foetal, F-37380 Nouzilly, France

³CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière, F-37044 Tours, France

Les systèmes CRISPR/Cas constituent un mécanisme important de défense développé par les bactéries, composés de deux grandes régions : le locus CRISPR, constitué d'unités repeat-spacer et l'opéron *cas*, en amont de ce locus. *Streptococcus agalactiae*, pathogène humain majeur, possède un système de type II-A, composé des gènes *cas9*, *cas1*, *cas2* et *csn2*. Des travaux préliminaires ont montré que les souches appartenant au ST17, considérées comme étant hypervirulentes au sein de l'espèce, possèdent significativement moins de spacers que les souches des autres lignées. Afin d'explicitier ces différences, nous avons centré notre travail sur l'étude de la région promotrice en amont de l'opéron *cas*, au sein de laquelle a été mise en évidence une délétion de 103pb chez les souches de ST17, entraînant la disparition du promoteur de l'opéron *cas*. L'analyse par fusion transcriptionnelle confirme l'absence d'activité de ce promoteur chez ces souches, corroborée par l'analyse par RT-qPCR, qui montre une expression très faible de *cas9*. Cette délétion pourrait ainsi impacter l'expression de l'opéron *cas* et donc le fonctionnement du système dans son ensemble, que ce soit dans sa capacité de défense vis-à-vis d'éléments génétiques étrangers, ou dans sa capacité d'intégration de nouveaux spacers au sein du locus CRISPR. Ces deux derniers points seront testés grâce à des expériences d'interférence et des expériences de challenge avec des bactériophages.

Thème : Bactériologie

Mots-clés : *Streptococcus agalactiae*, CRISPR/Cas, ST17

Réponses vasculaires aux lésions d'ischémie/reperfusion et implication du récepteur purinergique P2Y11

Piollet M.¹, Lefort C.¹, Benoist L.¹, Chadet S.¹, Ivanes F.^{1,2}, Muntean D³, Duicu O³, Sturza A³, Angoulvant D.^{1,2}

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

² Service de Cardiologie, CHU Trousseau, 37044 TOURS CEDEX

³ Laboratoire de physiopathologie, Université Victor Babes, Timisoara, Roumanie

La maladie vasculaire du greffon, caractérisée par une hyperplasie intimale, est responsable à 5 ans post transplantation cardiaque d'environ 50% des pertes de greffon. Ce processus est en parti initié par les lésions d'Ischémie/Reperfusion (I/R) qui vont engendrer une inflammation stérile, une apoptose et activation des Cellules Endothéliales (CE) et une prolifération et migration vers l'intima des Cellules Musculaires Lisses (CML). Il a été montré que l'activation du récepteur purinergique P2Y11 (P2Y11R) avait un effet immunomodulateur sur les cellules dendritiques. Nous nous intéressons donc ici à l'effet de la modulation de P2Y11R sur les réponses aux lésions d'I/R au niveau vasculaire. Nous avons dans un premier temps travaillé à partir d'un modèle in vitro d'I/R simulée : 5h d'ischémie (1% O₂ – PBS) et 1h à 24h de reperfusion (21% O₂ – DMEM 1% SVF), sur des CML d'artères coronaires humaines (HCASMC) et sur des CE de veine ombilicale humaines (HUVEC). Nous avons montré que les deux types cellulaires expriment P2Y11R en conditions basales et après une séquence d'I/R. Les HUVEC soumises à une séquence d'I/R relarguent plus d'ATP dans le milieu extracellulaire. Le surnageant des HUVEC soumises à une séquence d'I/R induit une prolifération des HCASMC, mesurée par l'incorporation d'EdU. L'activation de P2Y11R par son agoniste le NF546 (10µM) tend à diminuer ces effets. De plus, à partir d'un modèle d'anneaux aortiques de rats, nous montrons que l'augmentation de la contractilité vasculaire induite par l'Angiotensine II est réduite lorsque P2Y11R est activé, et que la relaxation est améliorée. Ces résultats montrent que l'activation des CE après une séquence d'I/R peut être modulée par l'activation de P2Y11R, ce qui tendrait à diminuer les réponses aux lésions d'I/R.

Mots clés : ischémie/reperfusion – endothélium – hyperplasie intimale – récepteurs purinergiques

The Central Nervous System as a Reservoir of HIV-1 variants resistant to Broadly Neutralizing Antibodies

Karl Stefic^{1,2}, Antoine Chaillon³, Mélanie Bouvin-Pley¹, Alain Moreau¹, Martine Braibant¹, Frédéric Bastides⁴, Guillaume Gras⁴, Louis Bernard⁴, Francis Barin^{1,2}

Université François Rabelais, Inserm U966, Tours, France; ² Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Bretonneau, Tours, France; ³ Department of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, California, USA; ⁴ Médecine Interne et Maladies Infectieuses, CHU Bretonneau, Tours, France

Background. Clinical studies using broadly neutralizing antibodies (bNAbs) are moving forward at increasing pace. Envelope glycoprotein evolve quickly under the selective pressure by autologous antibodies but also by adaptating to cell tropism in different compartments of the body, as it is the case for compartmentalized viruses isolated in the cerebrospinal fluid (CSF). This could impact the sensitivity to bNAbs. We analyzed the sensitivity to bNAbs of variants isolated from paired CSF and blood samples.

Methods. Paired contemporaneous CSF and blood plasma samples of 6 subjects with HIV-associated neurocognitive disorder infected by HIV-1 strains of 5 different clades were analyzed by single genome sequencing. Pseudotyped viruses expressing envelope glycoproteins representative of the quasi-species present in each compartment were generated. Their sensitivity to neutralization was measured using a TZM-bl assay and bNAbs targeting the different sites of vulnerability.

Results. Phylogenetic analyses revealed significant compartmentalization of HIV populations between blood and CSF in 4 out of 6 patients. In 5 patients, we observed major differences of sensitivity to at least one bNAb targeting the N160-V1V2 site, the N332-V3 site or the CD4bs, between blood and CSF variants, even for patients without compartmentalization. The last patient was highly resistant to all bNAbs but a 22-fold resistance to sCD4 of CSF variants was observed. Three patients had CSF variants with enhanced resistance either to PGT121 and PG16 (9 and 43 fold, respectively), to PGT145 and VRC03 (15 and 16 fold, respectively), or to PGT145 alone (7 fold) compared to blood variants. Sensitivity to 10E8 was similar in both compartments for all patients.

Conclusion. Our data show the presence of bNAbs-resistant viruses in patients naive from bNAbs. Considering the low blood-brain barrier penetration of IgGs and the possible migration of HIV-1 from CSF to blood, these results should warn us on the potential role of CNS as a reservoir for selection of bNAbs resistant viruses.

NS1 des virus influenza : relations structure-fonction pour la recherche de nouveaux anti-viraux

Alan WACQUIEZ¹, Stéphane GOFFINONT², Virginie NADAN², Franck COSTE², Emmanuel KUT¹, Bertrand CASTAING² et Daniel MARC¹

¹Equipe « Pathologie et Immunologie Aviaire », UMR 1282 ISP, INRA Nouzilly

²Equipe « Réparations de l'ADN : Structure, Fonction et Dynamique », UPR4301 CBM, CNRS Orléans

Les virus influenza représentent un risque important en santé publique comme le montrent les épidémies saisonnières et les pandémies qui ont eu lieu depuis le début du 20^{ème} siècle. A l'heure actuelle, l'arsenal thérapeutique anti-influenza est limité à un vaccin annuel et deux molécules antivirales appartenant à la même famille des inhibiteurs de la neuraminidase virale, qui ne sont pas à l'abri de résistances.

Les virus influenza échappent au système de défenses cellulaires via la protéine non-structurale 1 (NS1). Cette protéine virale a la capacité d'inhiber le système interféron de type I, empêchant ainsi l'activation des défenses antivirales de la cellule (Marc, 2014). Nous avons montré que la protéine NS1 s'associait à des motifs conservés des ARN viraux positifs via son RNA Binding Domain (RBD) (Marc *et al.*, 2013). Nous avons également observé que la double-substitution R38A-K41A, invalidant le RBD, abolissait la virulence et réduisait la multiplication virale (Trapp *et al.*, soumis). Etant essentielle au bon déroulement du cycle viral, la protéine NS1 représente une cible thérapeutique prometteuse.

L'objectif de ce travail consiste à caractériser l'interaction entre la protéine NS1 et l'ARN viral dans le but de développer, *in fine*, de nouveaux inhibiteurs anti-influenza en ciblant spécifiquement cette interaction. Pour répondre à cet objectif, nous suivrons deux approches complémentaires : (i) déterminer la structure tridimensionnelle du complexe associant la protéine NS1 à l'ARN, après avoir défini et optimisé les conditions de sa cristallisation (ii) valider l'importance biologique de cette interaction dans le cycle viral par l'étude phénotypique de virus recombinants obtenus par génétique inverse, porteurs de mutations dans les motifs ARN potentiellement reconnus par NS1.

Thème : virologie structurale et moléculaire

Mots-clés : influenza, NS1, IFN, cristallographie à rayons x, drug-design

***Rauvolfia nukuhivensis*, a booster of the skin immune system by influencing cutaneous ecosystem and by preparing the innate immune system for a rapid and efficient response**

Florence Abdallah¹, Phila Raharivelomanana⁴, Elise Lupo¹, Lily Mijouin² Chantal Pichon^{1,3}.

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France

² Remedials Laboratoire, 91 rue du Faubourg Saint-Honoré, 75008, Paris

³ Université d'Orléans, Collégium Sciences et Techniques, Orléans, France

⁴ Université de la Polynésie Française, 98702 Faa'a, Tahiti

Rauvolfia is a well-known plant used for its wide range of beneficial effect in New Caledonia. It is made up of diverse indole alkaloids that are used in several traditional medicines as gynecological antiseptic and urticaria. Polynesian women use *Rauvolfia* during different stages and context of the life cycle (puberty, urinary infections, delivery and menopause). Another application of *Rauvolfia* is to relieve lesional skin during urticaria. The actual mechanism behind the virtue of this plant is still unknown. Hence, in this study we aimed at deciphering the impact of *Rauvolfia* on skin immune system and on cutaneous microbiota to scientifically explain its feature.

The gynecological antiseptic usage of *Rauvolfia* has prompted us to look at its effect on the intimate microbiota. In fact, *Lactobacillus acidophilus* known as the guardian of the vaginal tract prevents infections by maintaining a low pH environment and through hydrogen peroxide H₂O₂ and bacteriocin production that limits the virulence of bacterial pathogens as *Staphylococcus aureus*. As a matter of fact, *L. acidophilus* treated with 200 µg/ml of *Rauvolfia* resulted in increased production of secreted virulence factors, including H₂O₂, which in turn inhibited *S.aureus* growth.

Since *Rauvolfia* is thought to prevent infections, we looked at the actors of the innate immune system that is a major contributor in immunosurveillance. Indeed, 200µg/ml of *Rauvolfia* is sufficient to increase innate receptors (TLR3 and TLR5) resulting in enhanced sensing of pathogen invasion as well as a potentially stronger and immediate innate immune response via increased cytokines production such as CXCL-8 and IL-6. Moreover, we checked whether *Rauvolfia* application has an impact on the ability of keratinocytes (major components of the skin epidermis known to be the first line of defense against external insults) to produce antimicrobial peptides. Our data indicate that keratinocytes treatment with *Rauvolfia* led to an increased expression of S100A7, S100A8, and S100A9. Interestingly, *Rauvolfia* treatment resulted in increased keratinocytes and fibroblasts migration and in lack of hyperproliferation. Thus, *Rauvolfia* favors wound closure.

To sum up, *Rauvolfia* acts by preparing the immune system to be reactive and effective immediately through enhancing the innate immune response and by favoring commensal microorganisms to limit harmful pathogen invasion.

Theme : Immune characterization

Key words : *Rauvolfia*, skin immune system, innate immunity, wound healing, microbiota

Etude de la sumoylation de la neurofibromine, la protéine responsable de la neurofibromatose de type1

Mohammed Bergoug, Aurélie Cosson, Michel Doudeau, Fabienne Godin, Béatrice Vallée et Hélène Bénédicti

Centre de biophysique moléculaire, CNRS, Orléans

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique autosomale dominante. C'est l'une des maladies génétiques les plus répandues, elle touche 1 individu sur 3500. La NF1 se manifeste par une grande variété de symptômes cliniques: tâches café au lait, déformations osseuses, tumeurs du système nerveux périphérique ou du système nerveux central et problèmes cognitifs chez plus de 60% des enfants atteints de la maladie. Actuellement, il n'existe aucun traitement ciblé pour soigner la NF1.

Le gène supresseur de tumeurs *NF1* est le responsable de cette maladie. Il code une protéine de 2818 résidus, la neurofibromine (Nf1). Nf1 est une « GTPase-activating protein » de Ras (Ras GAP). Quand Nf1 est mutée, une suractivation des voies de signalisation en aval de Ras est observée. Nf1 intervient aussi dans la dynamique du cytosquelette d'actine et dans la régulation du taux de l'AMP cyclique. Récemment notre équipe a montré que Nf1 est colocalisée avec les corps PML dans le noyau, or ces corps nucléaires sont hautement régulés par une modification post-traductionnelle (MPT) spécifique : la sumoylation. Ce qui suggère qu'elle pourrait également être modifiée par sumoylation. Mon projet de thèse consiste donc à étudier la sumoylation de Nf1, et à comprendre le rôle de cette MPT dans la régulation de Nf1 et dans la neurofibromatose de type1.

La sumoylation est une MPT qui consiste à établir une liaison covalente entre une ou plusieurs protéines SUMO « Small ubiquitin like modifier » et un résidu Lysine de la protéine cible. L'analyse de la séquence de la protéine Nf1 par le programme JASSA a permis de prédire 10 sites consensus potentiellement sumoylés.

J'ai montré que l'un des domaines de la protéine Nf1, appelé SecPH est modifié par la protéine SUMO2, et qu'il présente différentes formes de sumoylation : mono-Sumoylée et multi-Sumoylée. J'ai également commencé l'identification des sites exacts de sumoylation en mutant les lysines prédites comme étant sumoylées, et en comparant le profil de sumoylation de Nf1 sauvage avec ceux des mutants. Je vais également étudier l'impact de la sumoylation de Nf1 sur la régulation de son activité GAP ainsi que sur son interaction avec des partenaires identifiés par l'équipe ou dans la littérature.

Thème : Biologie cellulaire et modifications post-traductionnelles.

Mots-clés : Neurofibromatose de type1, modifications post-traductionnelles, sumoylation, Interactions proteine/proteine, signalisation cellulaire

Development of an original footprinting approach to localize non-covalent ligand binding sites

Teddy BIJOT, Guillaume GABANT, Martine CADENE

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, CS80054, 45071 Orléans Cedex 2,
France

Protein/ligand interactions are the basis for cellular signalization processes and the action mechanism of drugs. Several approaches allow for the localization of interactions such as directed mutagenesis, HDX, hydroxyl radical footprinting, co-crystallization or NMR. Most techniques either do not provide detailed structural information or are time consuming. We are developing a new footprinting method to determine the site of ligand binding on a protein, combining speed and site location. Here we present a method based on limited proteolysis in single-hit statistics conditions using MALDI-TOF MS. Nonspecific proteinases generate a molecular cleavage ladder and its complementary. The cleavage sites obtained in the presence and absence of ligand are compared. If a cleavage is not detected in the presence of ligand, it means that the cleavage site is masked by the ligand. Reporting masked sites onto the protein 3D structure allows for the visualization of the binding site. Once determined, the exact binding site can be used to model the interaction of the protein with the reference ligand, thus providing a basis for rational ligand design. In comparison with existing footprinting methods, our approach has the potential to make interpretation of the data faster and easier. To develop our methodology, we have decided to work on targets involved in cancer, particularly metastasis. Although it is the first cause of lethality in cancer disease, there is no treatment specifically targeting the spread of metastatic cells at this time. Ultimately, this methodology could be extended to different kinds of protein/ligand systems.

Theme: Methodology

Key words: Mass spectrometry, localization of non-covalent binding.

Towards the synthesis of ThyX inhibitors against biowarfare agents

Nicolas. G. Biteau,⁽¹⁾ Florian Chevrier,⁽¹⁾ Vincent Roy,⁽¹⁾ Luigi. A. Agrofoglio.⁽¹⁾
Université d'Orléans, Institut de Chimie Organique et Analytique - ICOA UMR 7311, FR CNRS 2708

L'émergence de nouvelles **bactéries multirésistantes (BMR)** à de nombreux médicaments a été amplifiée ces dernières années par l'utilisation immodérée des antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire, en agriculture.... Dans le monde, Europe de **1.8 millions de décès/an** des suites d'une infection par une des 5 principales BMR (**SARM, BLSE, EPC, ERG, ERV**), et de la **tuberculose**. Cette pénurie de molécules force à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'inverser la tendance.

Une nouvelle cible thérapeutique, la **Thymidilate Synthase (TS)**, permettant la méthylation de la position C₅ de l'Uracile conduisant ainsi à la biosynthèse de la dTMP. Cette dernière est connue sous deux formes, la ThyA chez l'homme et la ThyX ou chez les virus et bactéries. On s'intéressera plus particulièrement à la ThyX qui suit un mécanisme de type **Flavin-Dependent (FDTS)**. Leurs différences sur le plan structural, génétique et mécanistique permettraient une sélectivité importante contre des bactéries et virus hautement pathogène.

Ce poster comportera une partie biologie sur la cible thérapeutique visée et différentes voies de synthèses pour les différentes familles de molécules synthétisées :

-Flavin acyclo nucléoside analogues fluoré ou non en C5'

-Uracile C5 substitué acyclo nucléoside analogue fluoré ou non en C5'

- quinazolinedione et pyrido pyrimidinedione acyclo nucléoside analogue fluoré ou non en C5'.

La dernière partie, portera sur les tests biologiques préliminaires réalisés, allant du protocole, jusqu'aux différents résultats préliminaires pour les différentes familles.

Thème : Chimie, Biologie.

Mots-clés : ThyX, FDTS, inhibiteurs, antibiotique, synthèse, biologie.

Impact du statut nutritif azoté sur la dynamique des dysfonctionnements hydrauliques et de l'épuisement des réserves sous des conditions d'irrigations contrastées chez des arbres à croissance rapide (*Populus ssp.*)

L. Bouyer¹, L. Marchand¹, C. Vincent-Barbaroux¹, H. Cochard², M. Feinard-Duranceau¹, I. Le Jan¹, A. Delaunay¹, S. Chamailard¹, T. Barigah², F. Brignolas¹, R. Fichot^{1*}

¹Université d'Orléans, LBLGC EA 1207, INRA USC 1328 ARCHE, Orléans F-45067, France

²UMR 547 PIAF INRA – Clermont Université, Clermont Ferrand F-63000, France

La disponibilité en eau et en éléments nutritifs font partie des facteurs abiotiques qui limitent le plus la productivité des forêts. Les événements de mortalité forestière liés à des sécheresses ont augmentés de façon spectaculaire au cours des 30 dernières années à travers le monde et tous les biomes sont concernés. Les mécanismes menant à la mort des arbres en réponse à une diminution de la disponibilité en eau du sol sont loin d'être complètement élucidés mais les dysfonctionnements hydrauliques et l'épuisement des réserves carbonées sont aujourd'hui considérés comme les deux causes principales. Cependant le rôle du statut nutritif azoté sur la modulation des dynamiques de dysfonctionnement hydraulique et d'épuisement des réserves reste encore peu étudié.

Les effets du statut nutritif azoté sur la dynamique des dysfonctionnements hydrauliques et des réserves en glucides non structuraux ont été étudiés dans des conditions de sécheresses modérées et sévères. Les expériences ont été menées en serre à partir de deux géotypes hybrides de peuplier, *Populus deltoides* × *P. nigra* cv. 'Koster' et *P. trichocarpa* × *P. maximowiczii* cv. 'Skado'. 320 boutures de 3 mois ont été réparties en 5 blocs randomisés. Les plants ont été soumis à la combinaison de deux niveaux de fertilisation azotée (0,5 contre 10 mM de NH₄NO₃ dans une solution nutritive complète) et de trois niveaux de disponibilité en eau (contrôle, sécheresse modérée et sécheresse sévère). Des mesures régulières de hauteur, de diamètre, d'échanges de gaz foliaires et d'embolie native ont été effectuées au cours de l'expérience. Des mesures de vulnérabilité du xylème à la cavitation et des teneurs en glucides dans les feuilles et les compartiments ligneux (tige et racines) ont été réalisées à 6 dates de collectes.

La fertilisation azotée a stimulé la croissance, a accru la vulnérabilité à la cavitation et a diminué les réserves carbonées dans les feuilles et les racines pour les deux géotypes. Les arbres soumis à un arrêt d'arrosage ont atteint la perte de conductivité hydraulique létale (90%) en 15 semaines, alors que pour ceux soumis à une sécheresse modérée, l'embolie native était maintenue sous le seuil de 50%. Les premiers résultats suggèrent qu'une plus grande disponibilité en azote pourrait diminuer la capacité des arbres à faire face à la sécheresse en augmentant leur vulnérabilité à la cavitation et en réduisant leurs réserves glucidiques.

Délivrance d'oligonucléotides linéaires et circulaires pour une thérapie ciblée de STAT3 dans le cancer du sein triple négatif.

G. Casas¹, P. Baril¹, A. Delalande¹, C. Pichon¹, P. Midoux¹ et J.-M. Malinge¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, CS80054, 45071 Orléans Cedex 02

Représentant près de 15 % des cancers du sein, le cancer du sein triple-négatifs (CSTN) est insensible aux traitements actuels de thérapie ciblée. Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) est un facteur de transcription oncogénique impliqué dans le caractère agressif du CSTN. Notre projet porte sur le développement d'une stratégie thérapeutique innovante ciblant Stat3 avec des oligonucléotides ADN et ARN linéaires et ADN circulaires vectorisés. Une étude cellulaire avec des lignées murine et humaine de CSTN montre que la délivrance combinée d'oligonucléotides anti-Stat3 sous forme de leurre moléculaire ADN (ciblage protéique) et de siRNA (ciblage de l'ARNm) induit une augmentation synergique de l'activité anti-proliférative. Dans cette stratégie, une nanoparticule de lipides et de polymères histidylés (lipopolyplexe) est utilisée pour co-encapsuler et délivrer de façon équimolaire les deux acides nucléiques. L'impact de ce traitement sur la migration de cellules CSTN a été également étudiée. *In vivo* avec le modèle murin 4T1 de CSTN, la délivrance intratumorale des deux acides nucléiques co-encapsulés a permis une forte diminution de la taille de la tumeur primaire et du nombre de nodules pulmonaires métastatiques. Plusieurs facteurs de transcription doivent être ciblés pour inhiber la transcription oncogénique. Nous avons conçu et breveté un nouveau type de leurre moléculaire sous forme circulaire pour cibler plusieurs facteurs de transcription à la fois. Un leurre co-ciblant les facteurs de transcription Stat3 et NF- κ B inhibe fortement la prolifération des cellules de CSTN. Notre approche de ciblage de facteurs de transcription semble prometteuse dans le CSTN et sera poursuivie par des expériences *in vivo* reliées à un choix optimisé de combinaison.

Synthèse et évaluation biologique de nouveaux dérivés de l'acide éthacrynique comme agents anticancéreux

Abdelmoula ELABBOUCHI ^{(1),(2)}, Nabil EL BRAHMI ⁽¹⁾, Serge MIGNANI ⁽³⁾, Abdelmajid ZIAD ⁽⁴⁾, Thierry CRESTEIL ⁽⁵⁾, Mosto M. BOUSMINA ⁽¹⁾, Jean-Pierre MAJORAL ⁽⁶⁾, Franck SUZENET ⁽²⁾, Gérald GUILLAUMET ⁽²⁾, Saïd EI KAZZOULI ⁽¹⁾.

(1) Faculté Euromed de Génie, Université Euro-Méditerranéenne de Fès, Route de Meknès (Rond-Point Bensouda) 30000 Fès, Morocco. Email: a.elabbouchi@euromed.org

(2) Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, rue de Chartres - BP 6759 45067 Orléans Cedex 2.

(3) Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, CNRS UMR 860, Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologique et toxicologique, 45, rue des Saints Pères, 75006 Paris

(4) Laboratoire de Génie Biologie, Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques, BP 523, 23000 Beni-Mellal, Morocco.

(5) Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, Avenue de la Terrasse, 911190 Gif sur Yvette, France. Present address: IPSIT, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, 92290 Chatenay-Malabry.

(6) Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, 205 route de Narbonne, BP 44099, 31077 Toulouse cedex 4

L'acide éthacrynique (symbolisé par les lettres **AE**), ou acide [2,3-dichloro-4-(2-méthylène-1-oxobutyl)phenoxy] acétique (C₁₃H₁₂Cl₂O₄) (Schéma), appartient au groupe des diurétiques les plus efficaces¹.

AE est cytotoxique après une administration intraveineuse², un effet qui est lié à la dose³. **AE** possède une fonction acide et une unité carbonyle α,β -insaturée qui peut être considérée structuralement comme un accepteur de Michael. Cette fonction active est souvent employée dans la conception d'inhibiteurs d'enzymes. Par exemple, **AE** est connu comme un bon inhibiteur de la glutathione-S transférase P1-1 (GSTP1-1)^{4,5} surexprimée dans une grande variété de cellules cancéreuses, et qui augmente encore plus dans les cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie. Très récemment, notre équipe a synthétisé une série d'analogues **AE** ayant de fortes activités antiprolifératives contre des tumeurs liquides et solides⁶.

Dans cette communication, nous souhaitons présenter nos résultats récents des tests *in vitro* ainsi que le mécanisme d'action des analogues **AE** qui implique une activation de la caspase-3. Les analogues **AE** les plus actifs sont actuellement soumis à une évaluation *in vivo*. Ces travaux seront également abordés dans cette

communication par affiche.

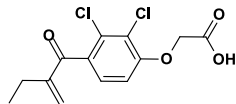


Schéma : L'acide éthacrynique (**AE**).

Thème : Thérapeutique

Mots-clés : acide éthacrynique, glutathion S-transférase P1-1 (GSTP1-1), cancer, caspase-3

¹ Sprague, J. M., Diuretics. *Top. Med. Chem.* **1986**, 2, 1.

² a) Beauchamp, G. D.; Crouch, T. C., *J. Kans. Med. Soc.* **1975**, 76, 166. b) Schneider, W. J.; Becker, E. L. *Arch. Intern. Med.* **1966**, 117, 715. c) Schwartz, F. D.; Pillay, V. K.; Kark, R. M. *Am. Heart J.* **1970**, 79, 427

³ Boston Collaborative Drug Surveillance Program. A cooperative study. Drug-induced deafness. *JAMA.* **1973**, 224, 515.

⁴ Tew, K. D.; Dutta, S.; Schultz, M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 26, 91.

⁵ Iersel, M. L.; Ploemen, J. P.; Struik, I.; van Amersfoort, C.; Keyzer, A. E.; Schefferlie, J. G.; van Bladeren, P. J. *Chem.-Biol. Interact.* **1996**, 102, 117.

⁶ El Brahmi, N., Mignani, S. M., Carona, J., El Kazzouli, S., Bousmina, M. M., Caminade, A. M., Cresteil, T., Majoral, J. P., *Nanoscale*, **2015**, 7, 3915

Transcriptomic study of *Dunaliella.sp* cultivated under stressed conditions: Apoptotic activity of aqueous extract

Fatma Elleuch ^{1,2}, Patrick Baril ², Slim Abdelkafi ¹, Chantal Pichon ², Imen Fendri ¹

¹ Biological Engineering Department, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia

² Center for Molecular Biophysics (CBM), CNRS UPR4301, Orleans, France

Microalgae represent an important source of high added-value compounds as polyunsaturated lipids, proteins, vitamins and pigments. *Dunaliella.sp* is a green microalga known for its ability to produce high levels of carotenoids under well-defined growing conditions. These compounds are famous by their antioxidant and anticancer activities. The aim of this study is i) to optimize these conditions for higher carotenoids production and ii) to evaluate the effect of different extracts of *Dunaliella* cultivated under stressed (DSS) and unstressed conditions (DSC) on a model of murine cell breast cancer, 4T1.

We used the response surface methodology (RSM) according to Box-Behnken design. The study concerns the simultaneous effect of salinity, light intensity and nitrogen availability. The cell response to this stress was examined by analysing the level of mRNA expression of six genes using QPCR: Enolase (*Eno*), 1-deoxy-D-Xylulose 5-phosphate Synthase (*DXS*), Lycopene β -Cyclase (*LCYB*), chloroplast-localized Heat Shock Protein (*HSP70*), chloroplast Ribulose Phosphate-3-Epimerase (*RPE*) and Carotene Globule Protein (*Cgp*). Thanks to the optimization, the carotenoid amount was shown to be increased more than twice in stressed (vs unstressed) *Dunaliella*. At transcriptomic levels, *Cgp* and *LYBC* increase significantly at 72h.

The triple-negative breast cancers are a highly aggressive breast cancer as they cannot be treated with the conventional endocrine therapy or targeted therapies as they are characterised by the absence of estrogen (ER), progesterone (PR), and HER2 receptors. 4T1 murine breast cancer cells were used to study the effect of different extraction methods from DSS and DSC. The obtained results show that the aqueous extract of DSS is the most toxic. TUNEL assay and agarose gel analysis of genomic DNA revealed a DNA fragmentation. The PARP protein responsible for the maintaining of DNA integrity was desactivated and cleaved in dose and time depending manner. The internal pathway of caspase 3 and 9 were also activated. In conclusion, the optimised conditions induce an up-regulation of *Cgp* and *LYBC* gene responsible for an up-accumulation of carotenoids among *Dunaliella*. Aqueous extract of stressed *Dunaliella* presents the higher anticancer activity and induces apoptosis phenomenon by activating caspase pathway.

Arylation directe des 7-azaindazoles dans l'eau

Soukaina FAARASSE^{1,2}, Franck SUZENET¹, Saïd El Kazzouli², Gérald GUILLAUMET¹

¹Université d'Orléans; Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UMR-CNRS 7311; Rue de charters, 45067 Orléans, cedex 2, France.

²Université euro-méditerranéenne de Fès (UEMF), Fès-Shore, Route de Sidi Harazem, 30070 Fes, Maroc;

Les composées hétéroaromatiques bicycliques sont des « buildings blocks » fondamentaux en synthèse organique, on les retrouve dans des nombreux produits naturels, produits pharmaceutiques et dans une multitude de molécules biologiquement actives.

Parmi ces composés, les pyrazolopyridines continuent d'attirer une attention considérable, principalement, en raison de leur très large spectre d'activités biologiques. Ce système bicyclique a été rapporté pour avoir de nombreuses activités biologiques comme antagoniste des récepteurs A1 anti-bactérien, antiviral, et anti-inflammatoire.

Ainsi, nous avons développé un système catalytique au palladium efficace et relativement peu coûteux pour l'arylation directe des 2H-pyrazolo [3,4-b] pyridines avec les iodures d'aryle en utilisant l'eau comme solvant réactionnel, Ce protocole simple permet d'accéder à divers des pyrazolo [3,4-b] pyridines aryles en C3 en une seule étape avec des rendements élevés et une excellente sélectivité.

Thème : Chimie hétéroaromatique

Mots-clés : Arylation directe, pyrazolo [3,4-b] pyridine

Utilisation de la thermophorèse à micro-échelle (MST) pour l'étude des interactions enzyme-inhibiteur

Syntia Fayad, Reine Nehmé, Philippe Morin

Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans - CNRS, UMR 7311, Orléans, France

La thermophorèse à micro-échelle ou MST est une technique introduite en 2008 pour quantifier les affinités moléculaires en solution. Elle est basée sur le phénomène physique de thermophorèse qui est directement lié au mouvement d'un composé dans un gradient de température (*Jerabek M., Assay Drug Dev. Technol., 2011, 9*). La thermophorèse dépend de la taille, la charge, la couche de solvation et la conformation des molécules et lors de l'interaction d'un ligand avec une cible, au moins un de ces paramètres est modifié entraînant une variation du signal MST et la détermination de la constante de liaison.

Dans ce travail, la MST a été utilisée pour la première fois pour l'étude de l'interaction de l'élastase neutrophile humaine (HNE) et d'un inhibiteur et plus précisément l'acide ursolique. Puisque la solubilité de cet acide en milieu aqueux où la réaction enzymatique aura lieu est limitée, l'effet de deux solvants, DMSO et éthanol sur l'HNE a été étudié. Les courbes de thermophorèse enregistrées ont montré une perturbation du signal observé en présence du DMSO, indiquant une agrégation de l'enzyme. Cette agrégation était absente en utilisant l'éthanol comme solvant à condition de ne pas dépasser les 20 % (v/v) dans le milieu réactionnel. En utilisant ainsi l'éthanol, la courbe dose-réponse a été tracée et la constante d'inhibition K_i a été déterminée. Cette valeur a été comparée avec la valeur de la littérature et celle obtenue par électrophorèse capillaire (EC), permettant ainsi de valider les résultats obtenus par MST et montrant son efficacité à fournir des informations complémentaires à l'EC dans l'étude des interactions enzyme-inhibiteur (*Fayad S., J. Chromatogr. A, 2016, 1431*).

Thème : Chimie analytique

Mots-clés : électrophorèse capillaire, élastase, inhibition, thermophorèse à micro-échelle

Altérations rétiniennes et hypersensibilité visuelle dans le syndrome de l’X-fragile

Felgerolle C², Pâris A², Ardourel M², Rossignol R², Ranchon-Cole I³, Briault S^{1*} & Perche O^{1*}

¹CHR Orléans, Service de Génétique, Orléans ; ²UMR7355 CNRS Université Orléans, Orléans ; ³ UMR INSERM 1107, Clermont-Ferrand ; *Co-Dernier Auteurs

Le syndrome de l’X-fragile (FXS) est la déficience intellectuelle (DI) monogénique de la plus fréquente chez l’homme (1/3000 naissances). Outre la DI, les patients présentent des troubles du spectre autistique ainsi que des perturbations sensorielles parmi lesquelles, une altération des fonctions visuelles caractérisée par une diminution de la sensibilité aux contrastes, aux textures et aux mouvements. Ce phénotype clinique cérébral est lié à l’absence de la protéine cérébrale FMRP, protéine régulatrice de la traduction protéique neuronale et gliale, due au *silencing* du gène *FMR1*. Au niveau cellulaire et moléculaire, la perte de FMRP engendre des anomalies structurelles et fonctionnelles des synapses. Cette immaturité neuronale est considérée comme l’origine du phénotype clinique de DI mais aussi des anomalies d’intégration des fonctions visuelles.

Cependant, récemment, nous avons montré que *Fmrp* est également exprimée dans le système nerveux périphérique visuel : la rétine, première structure responsable de la capture des stimuli lumineux, clé de la perception visuelle. Chez le modèle murin du FXS, la souris *Fmr1* KO, l’électrophysiologie de la rétine a démontrée de fortes altérations pouvant être interprétées comme une diminution des capacités de perception des contrastes et des textures. Ce phénotype électrophysiologique est en lien avec nos observations d’immaturité des neurones rétiniens. Ainsi, la perte de *Fmrp* dans la rétine engendre des altérations similaires à celles constatées au niveau cérébral. Par ailleurs, la réponse diminuée de la souris *Fmr1* KO à un test de comportement impliquant majoritairement la perception de stimuli visuels, plus que leur intégration, confirme que la partie périphérique du système visuel est, comme sa partie centrale, altérée.

Dès lors il devient nécessaire de comprendre l’implication de chacune de ces deux parties dans les symptômes de l’hypersensibilité visuelle des patients. Nos études porte sur la mise au point et l’étudie un modèle murin dans lequel seule la rétine voit son expression de *Fmrp* supprimée tandis que les aires cérébrales restent génétiquement intactes.

Thème : Neurogénétique, système visuel

Mots clés : X-fragile, FMRP, système visuel, rétine.

Développement d'un Polymère à Empreinte Moléculaire pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine

M.Ghazi. Ayari, P. Favetta, V. Hervin, V. Roy, M. Si-Tahar, L.A. Agrofoglio

ICOA – UMR CNRS 73311 – Université d'Orléans

Inserm U1100, Faculté de Médecine – Université de Tours

Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) sont des matériaux de synthèse obtenus par polymérisation de monomères autour d'une molécule patron. Après élimination de cette molécule, le polymère obtenu contient des empreintes, possédant des sites de reconnaissance hautement spécifiques et permettant diverses applications. Leur utilisation comme nanocargos (Drug Delivery System, Figure 1) d'agents thérapeutiques constitue un domaine très prometteur.^[1] Divers MIP-DDS permettant le transport de bioactifs par voie buccale, oculaire ou transdermique ont fait l'objet de récents développements, le bioactif étant libéré par des variations de pH, températures.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés, comme preuve de concept, à la synthèse d'un MIP permettant la libération contrôlée de la ribavirine (un analogue nucléosidique de la guanosine, à large spectre antiviral) au niveau des alvéoles pulmonaires.

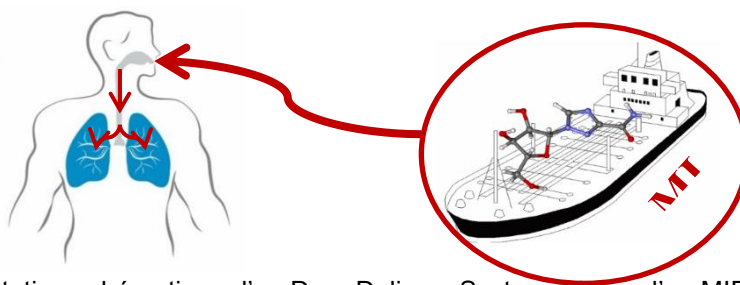


Figure 1 : Représentation schématique d'un Drug Delivery System à base d'un MIP-Ribavirine

Les objectifs sont :

- ✓ La création d'un MIP spécifique de la ribavirine
- ✓ L'étude de la cinétique de libération contrôlée dépendant de la température en milieu physiologique
- ✓ L'évaluation de la cytotoxicité de ce matériel sur des cellules épithéliales bronchiques.

Nous avons alors réalisé et optimisé la synthèse de divers MIPs en bulk, utilisant des monomères biocompatibles^[2] sur la base de liaisons hydrogène avec la ribavirine (acrylamide^[3], *N*-isopropylacrylamide, acide méthacrylique), ou par des interactions π -stacking et/ou Watson-Crick (*N*¹-acryloylthymine, *N*¹-acryloyluracile). Les constantes thermodynamiques du polymère (capacité, constante d'association) ont été extraites des isothermes d'adsorption. Le taux de gonflement de ces MIPs et la cinétique de libération de la ribavirine ont été mesurés à différentes températures. Ainsi, pour le MIP à base d'acrylamide et de *N,N*'-méthylène bisacrylamide, on mesure une capacité de 30 $\mu\text{mol/g}$ et une cinétique de libération de la ribavirine en milieu PBS qui est température-dépendante. Des premières études de cytotoxicité sur des cellules épithéliales bronchiques ont montré une absence de toxicité. Cette étude permet de nouveaux développements dont les MIP sphériques.

[1] – C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *J. Chromatogr. B*, **804**, 231-245 (2004)

[2] – P.Lulinski., *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **70**, 601-609 (2013)

[3] – L. Xu, Z. Xu, *J. Polym. Res.*, **19**, 9942- 9947 (2012)

Ce travail a reçu le soutien de la Région Centre Val de Loire (projet Cargo-Ther).

Effet de l'intensité de l'exercice sur les réponses à l'apnée dynamique en natation

Guimard^{1,2}, K. Collomp^{1,2,3}, H. Zorgati⁴, S. Brulair^{1,2}, X. Woorons⁵, V. Amiot⁶, F. Prieur^{1,2}

¹CIAMS, Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay ; ²CIAMS Université d'Orléans ; ³Département des Analyses, AFLD, Chatenay-Malabry ; ⁴PFE, University of Sousse, ⁵URePSSS, Université de Lille, ⁶Service de Médecine du Sport et d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, CHR d'Orléans

L'apnée est couramment utilisée lors de compétitions de natation afin de réduire le nombre de respirations durant le sprint ou afin d'améliorer la coulée sous l'eau. Cette pratique est aussi employée pour l'entraînement en raison des améliorations attendues de la capacité aérobie et/ou anaérobie. Cependant, les effets de l'intensité de l'exercice sur les réponses aiguës à l'apnée dynamique n'ont à ce jour pas été explorés. Neuf nageurs ont effectué un 50m nage libre dans quatre conditions différentes : à vitesse sous-maximale ($V_{\text{sous-max}}$) en apnée, à $V_{\text{sous-max}}$ en respiration normale, à vitesse maximale (V_{max}) en apnée et à V_{max} en respiration normale. Quelle que soit la condition respiratoire, la fréquence cardiaque pic et la lactatémie post exercice étaient significativement plus faibles à $V_{\text{sous-max}}$ qu'à V_{max} et la durée de l'exercice était significativement plus élevée à $V_{\text{sous-max}}$ qu'à V_{max} . Ce résultat indique que la dépense énergétique était effectivement plus faible à $V_{\text{sous-max}}$ qu'à V_{max} . En apnée, une baisse importante de la saturation artérielle en oxygène (SaO_2) se produisait à la fin et après l'exercice. La valeur minimale de SaO_2 était atteinte 10-11 s après la fin de l'effort à $V_{\text{sous-max}}$ et V_{max} et cette valeur n'était pas significativement différente entre les deux intensités ($82 \pm 3\%$ et $84 \pm 3\%$, respectivement). Ce résultat montre que malgré la plus faible intensité métabolique de l'exercice à $V_{\text{sous-max}}$ qu'à V_{max} , la désaturation artérielle était identique aux deux intensités. La durée plus longue de l'apnée à $V_{\text{sous-max}}$ expliquerait pourquoi SaO_2 atteignait les mêmes valeurs à $V_{\text{sous-max}}$ qu'à V_{max} .

Thème : physiologie de l'exercice

Mots-clés : apnée dynamique, réponses à l'apnée, natation.

Inhibitors of GGL (Glycoglycerolipids) biosynthesis in *E. faecalis*: synthesis and biological evaluation

Justyna Jaszczyk, Cyril Nicolas, Olivier Martin

ICOA, Université d'Orléans

E. faecalis is a commensal gut bacterium which has recently emerged as one of the major human pathogens by frequently causing hospital-acquired and device-associated infections. It easily forms biofilms, a process that makes treatment by antibiotics especially difficult. Although biofilm formation mechanism has not been fully unraveled, it is linked to the constitution of the bacterial cell wall. One of the main building elements is a Glc2DAG glycolipid, which serves as the anchor to Lipoteichoic Acid (LTA) molecules. The biosynthesis of the cell wall glycolipid involves the action of two glucosyl transferases (GlcT), identified very recently by their genes *bgsA* and *bgsB*. Theilacker *et al.* have investigated the deletion of the GlcT genes in targeted bacteria and shown that biofilm formation is nearly completely abolished. The main objective of the project is reproduction of the effect of *bgsA/B* gene deletion using potent GlcT inhibitors. New structures intended to mimic the donor substrate have been designed and their synthesis will be presented. In combination with antibiotics, such compounds could lead to extremely efficient protocols for the treatment of infections caused by resistant bacterial strains.

Thème : Organic synthesis, methodology, medicinal chemistry

Mots-clés : Inhibition, glucosyl transferase, iminosugar, biofilm formation

Première description cinétique du mécanisme d'échange de chaînes de la protéine HU d'*Escherichia coli*

Justine LARGILLIERE^a, Rémy LE MEUR^b, Martine CADENE^a, Bertrand CASTAING^a, Karine LOTH^{a,c}, Céline LANDON^a

^aCentre de Biophysique moléculaire – UPR 4301 – CNRS – Rue Charles Sadron – 45071 Orléans ; ^bVanderbilt University – Nashville – Tennessee – USA ; ^cCollegium Sciences et Techniques – Université d'Orléans – Rue de Chartres – 45100 Orléans

HU est la protéine majeure du nucléoïde bactérien (environ 30 000 protéines par cellule). Présente chez toutes les bactéries, elle intervient dans toutes les fonctions liées à l'ADN (compaction, réparation, transcription). Chez les entérobactéries, il existe deux gènes, hupA et hupB, codant respectivement pour les chaînes HU $_{\alpha}$ et HU $_{\beta}$ qui conduisent à la formation de trois dimères : HU $_{\alpha 2}$, HU $_{\beta 2}$ et HU $_{\alpha\beta}$ ayant chacun des fonctions biologiques propres. De plus, HU a la faculté de former spontanément l'hétérodimère à partir des homodimères.

Le mécanisme d'échange des chaînes se déroule en trois étapes : passage de chaque homodimère d'une conformation native, dite « fermée » (N₂), à une conformation intermédiaire, dite « ouverte » (I₂), formation d'un tétramère transitoire par association de deux I₂ et séparation du tétramère en deux hétérodimères.

Nous présentons, ici, la première description cinétique de ce mécanisme obtenu grâce à l'utilisation de méthodes d'analyse complémentaires telles que la Résonance Magnétique Nucléaire, la Spectrométrie de Masse en condition native et la microcalorimétrie.

Thème : Protéines chaperonnes

Mots-clés : HU, cinétique, dynamique, Résonance Magnétique Nucléaire, Spectrométrie de Masse

Le venin de frelon: source de molécules bioactives pour la dermocosmétique

Thao Nhi LE¹, David DA SILVA¹, Eric DARROUZET², Patrick BARIL³, Cyril COLAS^{1,3}, Pierre LAFITE¹, Richard DANIELLOU¹, Lucie PETIT LESEURRE⁴, Benoît MAUNIT¹

¹ Université d'Orléans, UMR 7311 Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), rue de Chartres - BP 6759, 45067Orléans Cedex 2, France.

² Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI) UMR 7261, Faculté des Sciences et Techniques, Avenue Monge, Parc Grandmont 37200 TOURS France.

³ Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), UPR 4301, rue Charles Sadron, CS 80054, 45071 Orléans cedex 2.

⁴ CHIMEX, 16 rue Maurice Berteaux, 95500 Le Thillay, France.

La recherche de nouveaux composés pour prévenir ou atténuer le vieillissement de la peau et également d'améliorer l'image de soi est une priorité des recherches actuelles dans les cosmétiques actifs.

Nos travaux consistent à étudier une source particulière de molécules potentiellement bioactives en l'occurrence le venin de frelons asiatiques. Un venin est un milieu complexe de biomolécules de masse moléculaire étendue pouvant être réunies en deux fractions : une fraction protéique et peptidique qui représente environ 90 % du poids sec du venin et une fraction non peptidique dans laquelle on retrouve des amines biogènes, des sucres, des nucléotides, des nucléosides et acides nucléiques. Cette diversité moléculaire confère aux venins un intérêt tout particulier en tant que source de molécules bio-optimisées et bioactives dans le domaine cosmétique.

En ce début de projet, nous comparerons deux méthodes d'échantillonnage de venin en se basant sur le profil protéique obtenu sur gel SDS 1D. Une différence significative a été montrée entre l'échantillonnage effectué par pression sur les sacs à venin (VF) et celui effectué en présence du sac à venin lui-même (ESF) en mettant en évidence un éventail de masses moléculaire allant de 4 kDa à 55 kDa. Une étape de fractionnement du venin brut par chromatographie d'exclusion stérique (colonne Superdex 75 Increase) a été réalisée et a permis d'obtenir une vingtaine de fractions.

Celles-ci ainsi que le venin brut ont fait l'objet, par chromatographie sur couche mince (CCM), de tests d'activité antioxydant (DPPH, FRAP) ainsi que l'évaluation d'inhibition de la tyrosinase impliquée dans les processus de l'hyperpigmentation et blanchiment de la peau. Les résultats ont révélé un potentiel antioxydant du venin brut et une efficacité peu significative concernant l'inhibition de la tyrosinase. Ces résultats préliminaires font l'objet d'études sur cellules B16F10 (mélanogénèse) permettant d'estimer le caractère cytotoxique du venin brut et des fractions, ainsi que l'activité antioxydante (ROS) et inhibitrice.

Mots-clés : Venin, *Vespa velutina*, antioxydant, tyrosinase, cytotoxicité, Exclusion stérique.

Remerciements : ARD2020 Cosmétosciences-région Centre Val de Loire pour le financement de ce projet

Actes du 30^{ème} Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 12-13 Octobre 2017

Etude métagénomique des mécanismes nucléaires de contrôle qualité et dégradation de l'ARN

Kévin MOREAU, Aurélia LE DANTEC, Christine MOSRIN-HUAMAN, Benoît PIEGU* et Yves BIGOT* & A. Rachid RAHMOUNI

CNRS UPR4301, *centre de biophysique nucléaire*

*INRA-CNRS UMR7247, unité *Physiologie de la Reproduction et des Comportements*

Lors de la transcription, les ARN messagers (mRNAs) naissants vont être recouverts de facteurs protéiques diverses afin de les maturer et de les empaqueter pour qu'ils puissent être exportés vers le cytoplasme, sous forme de particule ribonucléoprotéiques (mRNPs) dans le but d'y être traduits. Les diverses étapes de la biogénèse de ces mRNPs sont soumises au monitoring stricte du système de contrôle qualité, sensible à tous problèmes de maturations et/ou d'empaquetage. Afin d'étudier ce système, l'équipe a développé un outil qui consiste à exprimer l'hélicase translocase bactérienne Rho dans la levure. La présence de Rho dans le noyau de la levure va avoir pour effet de dépléter certains transcrits des facteurs protéiques qui les recouvrent, et ainsi les rendre substrats pour la machinerie de dégradation des ARNs (exosome) permettant l'étude de cette dernière dans différents contextes génétiques (déplétion de certains facteurs de l'exosome).

Le projet de thèse a pour objectif d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'actions du système de contrôle qualité des ARNs par des approches transcriptomiques et génomiques (RNA-seq, RIP-seq, CHIP-seq). Les différentes expérimentations et analyses ont déjà permis d'identifier deux machineries distinctes de dégradation des ARNs aberrants qui passeraient par deux systèmes de contrôles qualités distincts. Les différentes observations et analyses se font via deux modèles, l'un chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le second dans des lignées cellulaires humaines (HEK293 et HeLa).

Identification des sites de terminaison de transcription Rho-dépendantes dans les génomes bactériens

Cédric Nadiras, Eric Eveno, and Marc Boudvillain

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

Le facteur Rho est une hélicase ARN hexamérique sous forme d'anneau qui gouverne l'une des deux principales voies de terminaison de la transcription bactérienne. Des études récentes de transcriptomique ont identifié des centaines de loci de terminaison Rho-dépendante dans les génomes de bactéries représentatives telles qu'Escherichia coli. Quelques terminateurs Rho-dépendants ont été caractérisés en détail mais ces études n'ont pas permis de dégager des règles de sélection ou une séquence consensus. Bien que les déterminants de la terminaison Rho-dépendante soient mal compris, il est généralement admis que Rho se fixe au transcrit naissant au niveau d'un site Rut (Rho utilisation) en amont du site de terminaison. Être capable de prédire l'emplacement et l'efficacité des terminateurs Rho-dépendants dans les génomes bactériens constituerait une étape importante pour mieux comprendre ce processus important de régulation génique. Nous combinons des approches de biochimie et de bio-informatique pour tenter de définir les caractéristiques de ces sites Rut et pour développer un algorithme capable de détecter dans un génome entier les terminateurs Rho-dépendants. Nous détaillerons notre stratégie expérimentale et les différents descripteurs numériques des sites Rut que nous avons identifiés. Nous présenterons la version v1.0 de notre modèle prédictif et discuterons de sa robustesse vis-à-vis des données expérimentales existantes.

Thème: Régulations géniques bactériennes.

Mots-clés: ARN, transcription, terminaison, Rho

Peupliers hypométhylés & stress hydrique : Rôle de la méthylation de l'ADN dans la modulation de la réponse au stress hydrique

Mamadou Dia Sow¹, Anne-Laure Le Gac¹, Sophie Lanciano², Alain Delaunay¹, Isabelle Le Jan¹, Jorg Tost³, Vincent Segura⁴, Cristian Chaparro⁵, Christoph Grunau⁵, Régis Fichot¹, Marie Mirouze², Franck Brignolas¹, Steeve Strauss⁶, Stéphane Maury¹

¹ LBLGC EA1207, INRA, Université d'Orléans, USC 1328, 45067, Orléans, France

² IRD, UMR 232 DIADE, University of Perpignan, Laboratory of Plant Genome and Development, France

³ Laboratory for Epigenetics and Environment, Centre National de Génotypage, CEA-Institut de Génomique, Evry, France

⁴ AGPF, INRA, UMR 588, 45160, Ardon, France

⁵ IHPE, Université de Perpignan, UMR 5244, 66100, Perpignan, France

⁶ Department of Forest Ecosystems and Society, Oregon State University, Corvallis, OR 97331-5752, USA

Face aux changements climatiques, les arbres, organismes pérennes et fixes, doivent développer différents mécanismes leur permettant de s'adapter et survivre. Les mécanismes épigénétiques tel que la méthylation de l'ADN constituent un outil de choix car pouvant être modulés par les contraintes environnementales. Cependant son rôle dans la plasticité phénotypique reste toujours un challenge (Bräutigam et al., 2013; Plomion et al., 2016). Dans cette étude, nous avons testé le rôle de la méthylation de l'ADN dans le méristème apical caulinaire (MAC) chez des lignées de peupliers hybrides RNAi *PtDDM1* (*Populus tremula x alba*) soumis à une sécheresse modérée suivie d'un ré-arrosage. Nous avons réalisé une caractérisation phénotypique à différentes échelles montrant que les lignées hypométhylées étaient moins affectées par la contrainte. Afin d'explicitier ces différences phénotypiques, une étude du méthylome (WGBS) et du mobilome (Mobilome-seq) a été menée ; ce qui a permis d'identifier des régions différentiellement méthylées (DMR) et des éléments transposables actifs entre lignées et/ou stress spécifiques. Ces résultats suggèrent ainsi que la méthylation de l'ADN jouerait un rôle dans la modulation de la réponse durant le stress hydrique.

Analysis of lipid profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry in bovine ovarian follicle

Bertevello, P.S., Banliat, C., Teixeira-Gomes A.P., Labas V., Uzbekova S.
Pôle d'Analyse et d'Imagerie ex vivo des Biomolécules par Spectrométrie de Masse
INRA, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements F-37380 Nouzilly, France

Lipid metabolism at ovarian level play an important role for oocyte quality in different species, including cattle. Bovine oocyte is rich in intracellular lipids and its energy metabolism is tightly regulated by follicular cells. The aim of this work was to characterize lipids and their regulation enzymes in bovine ovarian follicle. Lipid profiles were compared between follicular cells, follicular fluid (FF) and enclosed oocyte (OO) using Intact cell MALDI-TOF Mass Spectrometry technology (ICM-MS) and gene expression were assessed using real-time PCR. Individual follicles from 12 Holstein cows were dissected to separate follicular granulosa cells (GC), theca layer (TH), cumulus cells (CC), FF and OO, and lipid spectral profiles were acquired from each sample cocrystallized with DHAP matrix using UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker) in positive (+) and negative (-) reflector modes. Follicular lipid fingerprints contain 462 peaks in (+) and 486 peaks in (-) modes in the mass to charge range from 100 to 1000 m/z, with coefficients of variation less than 33%. Differential analysis performed on normalized peak height values showed significantly different abundance of 97 molecular species in the oocytes and 70 species in FF ($p < 0.01$, fold change > 3) comparing to somatic follicular cells (TH, GC, CC). Among the identified lipids, lyso-phosphatidylcholines (LPC), lyso-phosphatidylethanolamines (LPE) and sphingomyelins (SM) were prevalent in the oocyte whereas phosphatidylcholines (PC) and SM were more abundant in FF. Follicular cells TH, GC and CC were clearly discriminated from OO and FF by their lipid fingerprints using Principle Component Analysis. Gene expression analysis of lipid metabolism key enzymes involved in lipogenesis, lipolysis, fatty synthesis, transport, elongation and oxidation, as well as in and glucose metabolism and steroidogenesis demonstrated significant differences in their mRNA abundance between TH, GC, CC and the oocyte. Therefore, follicular cell transcription patterns corroborated with compartment-specific lipid contents of ovarian follicle and help the understanding of molecular regulation of energy metabolism inside of ovarian follicle, which is crucial for the oocyte competence to develop healthy embryo.

Thème : reproduction, **Mots-clés** : cows, ovary, lipids, mass spectrometry

Actes du 30^{ème} Colloque BIOTECHNOCENTRE, Seillac 12-13 Octobre 2017

Synchronous birth is a dominant pattern in receptor-ligand evolution

Anna Grandchamp¹, Alexandra Louis², Hugues Roest Crollius² and Philippe Monget¹

¹ PRC, UMR85, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, F-37380 Nouzilly, France

² Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, CNRS, Inserm, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), F-75005 Paris, France

Interactions between proteins are key components in the chemical and physical processes of living organisms. Among these interactions, membrane receptors and their ligands are particularly important because they are at the interface between extracellular and intracellular environments. Many studies have investigated how binding partners have co-evolved in genomes during the evolution. However, little is known about the establishment of the interaction on a phylogenetic scale. Here, we systematically studied the time of birth of genes encoding human membrane receptors and their ligands in the animal tree of life, using bioinformatics and modelisation.

We find that 41% of the receptors and their respective first ligands appeared at the same time, representing 2.5 folds more than expected by chance, thus suggesting an evolutionary dynamic of interdependence and conservation between these partners. In contrast, 21% of the receptors appeared after their ligand, or three fold less often than expected by chance. 38% of receptors appeared before their ligand, as much as expected by chance. A deeper study of the three dimensional structures of the binding pockets and the evolutive strengths exerted on them suggests that the replacement of the ligand by molecular exploitation and coevolution are also frequents phenomenon during evolution.

Targeting the orphan receptor GPR88 by nanobodies (VHH) in order to modulate striatal opioid signaling

Thibaut Laboute, Lucie P Pellissier, Jorge Gandía, Yannick Corde, Julie Le Merrer, Jérôme AJ Becker

Équipe DRuGS, PRC, INRA UMR-0085, CNRS UMR 7247, Inserm, Université de Tours François Rabelais

GPR88, an orphan G-Protein-Coupled Receptor (GPCR), is exclusively distributed in the brain and highly expressed in the striatum. This receptor is implicated in a number of Central Nervous System (CNS) disorders. In the striatum, GPR88 is highly expressed in Medium Spiny Neurons (MSNs) where signals from other regions are integrated. *Gpr88* knockout mice show increased Opioid Receptors (OR) activity in the striatum and a chronic blockade of Delta Opioid Receptor (DOR) using naltrindole partially improved their motor coordination and normalized their spatial memory and anxiety.

Here, we studied the physical and functional proximity between GPR88 and other striatal GPCRs by BRET, including ORs. We demonstrated physical proximity between GPR88 and DOR, Kappa Opioid Receptor (KOR) and others striatal GPCRs but not with Mu Opioid Receptor (MOR). We next confirmed the colocalisation between GPR88 and all ORs by immunocytochemistry. Finally, we analysed the functional consequences of co-expressing GPR88 with striatal GPCRs on G protein and β -Arrestin-depend signaling pathways by BRET. GPR88 co-expression reduced DOR, KOR and MOR agonist-induced activity on G protein and β -Arrestin pathways in a dose-dependent manner. Our data provide new insights in orphan GPR88 function as an inhibitor of OR signaling.

Despite emerging interest for GPR88 pharmacology, the signaling mechanisms and biological functions of this orphan GPCR are still largely unknown due to the lack of potent and selective natural or synthetic ligands. We are now developing camelid antibody fragments (nanobody, VHH) targeting specifically GPR88. Such nanobodies will represent innovative tools to modulate GPR88 activity and, indirectly, opioid signaling.

Thème : Neurology, Immunology, pharmacology

Mots-clés : GPR88, VHH, nanobodies, pharmacology, BRET, Central Nervous System (CNS) disorders.

Résolution des conflits entre femelles de parasitoïdes: que la plus motivée gagne!

Anthony G.E. Mathiron, Patrice Pottier, Marlène Goubault

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

La compétition intraspécifique pour une ressource indivisible est très répandue dans le règne animal et peut mener à des interactions physiques entre individus. La valeur de la ressource convoitée peut en outre influencer l'agressivité et la résolution de ces conflits: les compétiteurs se battent plus pour une ressource de bonne qualité (valeur réelle de la ressource) mais également lorsqu'ils ont été privés de cette ressource (valeur subjective de la ressource). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux conflits entre femelles d'une guêpe parasitoïde solitaire, *Eupelmus vuilleti*, lorsqu'elles exploitent simultanément un hôte: une larve ou une nymphe de *Callosobruchus maculatus*. Nous avons montré que la résolution des conflits est influencée par la pré-expérience de ponte des femelles (sur larves ou nymphes), par leur charge en œufs et par la qualité de l'hôte pour lequel elles se battent (larve ou nymphe). En effet les femelles ayant pondus sur des nymphes (hôte de basse qualité) ont été plus motivées à se battre pour accéder à une larve (hôte de bonne qualité) lors des combats, ce qui montre l'effet conjoint de la valeur réelle et subjective de l'hôte dans la résolution de ces conflits.

Thème : Ecologie comportementale

Mots-clés : valeur de la ressource, choix de ponte, compétition intraspécifique, *Eupelmus vuilleti*

Etude de la dynamique de signalisation de la chémérine dans les cellules de granulosa humaines

Namya Mellouk¹, Christelle Ramé¹, Joëlle Dupont¹

¹INRA UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France CNRS UMR7247 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France Université François Rabelais de Tours F-37041 Tours, France IFCE F-37380 Nouzilly, France.

La chémérine est une nouvelle adipocytokine capable de se lier à trois récepteurs couplés aux protéines G: CMKLR1 (récepteur 1 des chimiokines), GPR1 (récepteur couplé à la protéine G 1) et CCRL2 (récepteur chimiokine (motif CC) 2). Récemment, un rôle du couple chémérine/CMKLR1 dans les fonctions ovariennes a été rapporté *in vivo* chez la souris (Tang et al., 2016) et *in vitro* chez l'humain (Reverchon et al., 2012). Cependant, les voies de signalisation qui sous-tendent l'activation du couple chémérine/CMKLR1 dans les cellules ovariennes sont peu décrites. Ainsi, l'objectif de nos travaux est d'étudier les mécanismes d'action de la chémérine via ses récepteurs CMKLR1 et CCRL2 au sein des cellules de granulosa humaine. Par western blot, nous montrons que la chémérine (200 ng/ml) active rapidement (5 minutes) la phosphorylation MAPK ERK1/2, P38 et Akt et plus lentement (30 minutes) la phosphorylation d'AMPK et de β -arrestine dans les cellules KGN. De plus nous observons par co-immunoprécipitation une hétérodimérisation du récepteur CMKLR1 et du récepteur CCRL2 dès 5 minutes de stimulation et qui augmente progressivement jusqu'à 60 minutes. Actuellement, d'autres expériences d'inhibition du récepteur CMKLR1 par l'utilisation de nanobodies (Peyrassol et al., 2016) et de suppression des β -arrestine 1 ou β -arrestine 2 par siRNA sont en cours afin de mettre en évidence une liaison directe de l'activation des voies de signalisation avec le récepteur CMKLR1 et une régulation de celles-ci par la voie β -arrestine.

Thème : adipocytokines et reproduction

Mots-clés : chémérine, CMKLR1, CCRL2, cellules granulosa humaine, signalisation

Perception émotionnelle : influence de l'état affectif

Marion Rochet^{1,2}, Lise Dreyfuss^{2,3}, Wissam El-Hage^{1,2}, Boriana Atanasova^{1,2}

¹ : Inserm U930, Imagerie et Cerveau, Equipe 4 Troubles Affectifs, 37200 Tours

² : UFR Sciences et Techniques, Université de Tours, 37200 Tours

³ : BIOFORTIS Sensory & Consumer, 44800 Saint Herblain

L'état affectif, dont la dépression, influence l'individu au niveau physiologique et comportemental. Cette étude a pour but d'étudier l'influence de l'état affectif (et plus particulièrement l'influence de symptômes dépressifs) sur la perception sensorielle et émotionnelle de l'individu. Soixante sujets ont été inclus dans cette étude. L'évaluation du niveau de dépression des sujets a permis de les répartir en deux groupes : groupe témoin (TEM) et groupe de sujets présentant des symptômes dépressifs (DLM). L'état affectif et émotionnel des participants ont été évalués à l'aide des échelles psychométriques. La méthode Sense'n Feel™ (développée par BIOFORTIS) a été utilisée afin de mesurer les réponses émotionnelles des sujets, suite à la perception de 5 stimuli sensoriels : 4 odeurs (fraise, ail, beurre rance et amande amère) et un produit alimentaire (madeleine). Les résultats obtenus ont démontré une diminution de l'intensité émotionnelle perçue pour 4 stimuli/5, chez les sujets DLM par rapport aux sujets témoins. Ces observations pourraient être utilisées pour approfondir les connaissances de la physiopathologie de la dépression.

Thème : Troubles affectifs

Mots-clés : olfaction, émotion, dépression

Implication du récepteur P2X7 dans un modèle murin de dépression

Trubat Romain, Pinchaud Katleen, Leman Samuel, Camus Vincent

Equipe 4 unité 930 INSERM

La dépression majeure est une maladie neuropsychiatrique complexe affectant une part grandissante de la population mondiale. Malgré son importance, les antidépresseurs actuellement disponibles démontrent des effets thérapeutiques limités. Les données bibliographiques récentes s'accordent sur l'implication de la neuroinflammation et des cytokines pro-inflammatoires, dont l'Interleukine 1 β (Il1 β), dans la physiopathologie dépressive. Le récepteur P2X7 (P2X7R), acteur majeur de la maturation de l'Il1 β constitue un bon élément de recherche afin d'améliorer le phénotype dépressif. Le but de cette étude est d'examiner le potentiel profil antidépresseur de souris transgénique KO pour P2X7R dans un modèle de stress chronique. Ces souris ont démontré, au moyen de tests comportementaux, une diminution de l'anxiété et de l'anhédonie, symptômes dépressifs. Cette amélioration pourrait s'expliquer par une diminution de l'activation microgliale qui a été observée par immunohistochimie (marqueur indirect de l'inflammation centrale) ainsi que l'inactivation de P2X7R. Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que l'Il1 β jouerait un rôle clé dans la physiopathologie dépressive et pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

Thème : Troubles affectifs

Mots-clés : dépression majeure, stress chronique, neuroinflammation, interleukine 1 β , P2X7R

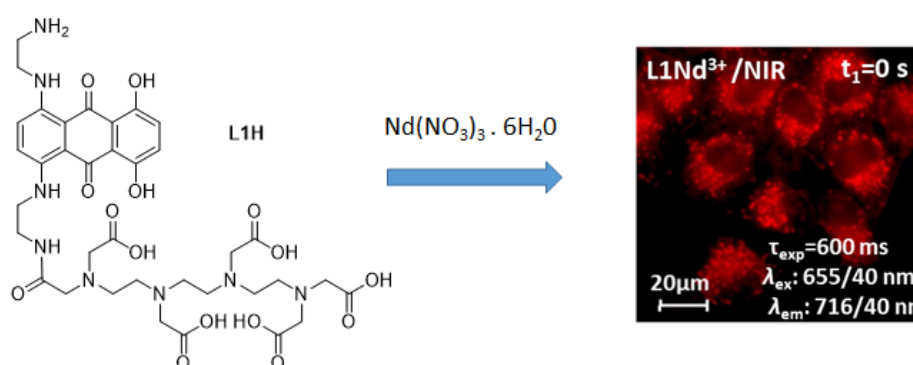
Synthesis of triethylenetetramine *N,N,N',N'',N''',N''''*-hexaacetic acid ligand for the formation of lanthanide complexes that absorb and emit in the near-infrared

Nicolas Chopin,^[a] Régis Delatouche,^[a] Ivana Martinic,^[b] Sylvain Routier,^[a] Svetlana V. Eliseeva,^[b] Stéphane Petoud,^[b] Franck Suzenet,^[a]

[a] Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UMR7311, Université d'Orléans - Pôle de chimie, rue de Chartres, 45000 Orléans.

[b] Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), UPR 4301, Rue Charles Sadron, 45000 Orléans.

In the field of optical biological imaging, the creation of near Infrared (NIR) lanthanide complexes present several complementary advantages in comparison to classical organic fluorescent probes. Indeed, NIR light can penetrate deeper in biological tissues which open perspectives of non-invasive fluorescence imaging. Furthermore, the low absorption of biomolecules in the NIR region leads to a lower level of interactions with biological materials. In this context, we established a project dedicated to the synthesis of a new kind of fluorescent lanthanide complexes able to absorb and emit in the NIR biological window. This fluorescent probe is combining a triethylenetetramine *N,N,N',N'',N''',N''''*-hexaacetic acid (TTHA) coordinating unit with a derivative of anthraquinone as an antenna. First cellular studies using such probes reveal interesting properties for labelling of lysosomes.



Thème : Chimie

Mots-clés : TTHA, Ligand, Anthraquinone, Lanthanide, LysoTracker.

Design and synthesis of novel quinoxaline-2-carboxylic acids and analogues as Pim-1 inhibitors

Bruno Oyallon¹, Marie Brachet^{2,6}, Pascal Bonnet³, Blandine Baratte⁴, Thomas Robert⁴, Sandrine Ruchaud⁴, Stéphane Bach⁴, Pascal Berthelot⁵, Fabrice Gouilleux², Marie-Claude Viaud-Massuard¹, Caroline Denevault-Sabourin¹

¹ UMR7292 GICC CNRS, IMT, University of Tours, F-37200 Tours, France ; ² UMR 7292, GICC CNRS, LNOx, University of Tours, F-37000 Tours, France ; ³ UMR CNRS-University of Orléans 7311, ICOA, University of Orléans, F-45067 Orléans, France ; ⁴ USR3151 CNRS/UPMC, KISSf, Station Biologique de Roscoff, F-29688 Roscoff, France ; ⁵ UMR-S 1172 - JPArc, University of Lille, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France ; ⁶ CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, F-37044 Tours, France.

The oncoprotein Pim-1 is a serine/threonine protein kinase involved in cell cycle regulation, cell survival, proliferation, and differentiation. This kinase is overexpressed in a large range of tumors¹, plays a crucial role in cancer drug resistance², and thus represents a relevant target for cancer therapy. We first screened our chemical library *in vitro* on a panel of kinases, allowing the identification of the quinoxaline-2-carboxylic acid **1** as a new lead compound, which was able to inhibit the *in vitro* enzymatic activity of *Homo sapiens* Pim-1 (*HsPim-1*), with an IC₅₀ of 74 nM. Docking studies demonstrated interesting interactions between compound **1** and several amino acids of the ATP-binding pocket of *HsPim-1*. We then determined a study model to initiate structure-activity relationships studies. Thus, 13 new derivatives were synthesized, and evaluated *in vitro* on *HsPim-1*, and on a panel of mammalian kinases to determine their selectivity profile. Finally, biological evaluations on human myeloid leukemia cell lines overexpressing Pim-1 were performed.

¹ C. Blanco-Aparicio et al. *Biochemical Pharmacology*. **2013**, *85*, 629-643.

² Y. Xie et al. *Mol. Clin. Oncol.* 2016, *4*, 13-17.

Inhibiting LIM Kinase: A possible treatment for neurofibromatosis type 1?

Anthony Champiré,⁽¹⁾ Karen Plé,⁽¹⁾ Hélène Bénédicti,⁽²⁾ Sylvain Routier⁽¹⁾

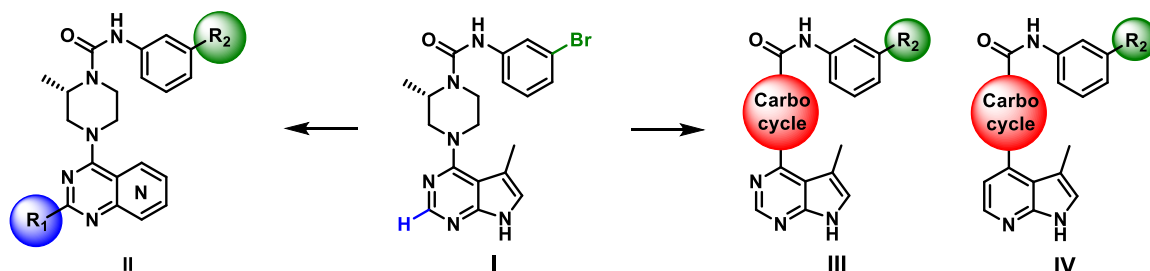
(1) Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UMR CNRS 7311, Orléans, France.

(2) Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS, Orléans, France.

Neurofibromatosis is a disease which touches 1 in 3500 people worldwide. LIM-Kinase has been shown to be involved in the signaling pathway of this pathology,^(a) and its inhibition is a promising therapeutic target.^(b) As part of a project to develop new molecules for LIMK inhibition, we wished to use our synthetic experience for the preparation of new biologically active compounds.

Starting from the structure of **I**, one of the most efficient inhibitors of LIMK^(c), we have designed several new molecular series. A small library of pyridopyrimidine derivatives **II** with the hydrogen-donor acceptor in different positions or totally absent from the molecule was first developed to evaluate hinge binding. Secondly we synthesized several pyrrolopyrimidine and azaindoles **III** and **IV** replacing the central piperazine by different carbocyclic cores to determine its influence on the activity.

To date, these original pyridopyrimidines **II**, pyrrolopyrimidines **III** and azaindoles **IV** have been synthesized and tested on a kinase panel including LIMK2. Our first results have been encouraging and have resulted in the synthesis of new and more active molecules. New chemical modulations are also in progress to target ROCK, another kinase deregulated in patients affected by neurofibromatosis.



Bibliographic references:

^(a) Vallée, B.; Doudeau, M.; Godin, F.; Gombault, A.; Tchalikian, A.; de Tauzia, M.-L.; Bénédicti, H. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47283.

^(b) Petrilli, A.; Copik, A.; Posadas, M.; Chang, LS.; Welling, DB.; Giovannini, M.; Fernández-Valle C. *Oncogene*, **2014**, *33*(27), 3571-3582

^(c) Harrison, B. A. *et al. J.Med.Chem.* **2009**, *52*, 6515–6518.

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

Conférences :

Mergny JL	page 6	Cadena Castaneda D	p.42	Rochet M	page 93
Castaing B	page 7	Casas G	page 74	Roux B	page 51
Rolin D	page 8	Chopin N	page 95	Seren S	page 52
Maurel C	page 9	Creusat F	page 57	Sow M	page 87
Figiel S	page 10	Débare H	page 58	Stapane L	page 53
Kouzi F	page 11	Deneuve Q	page 43	Stefic K	page 67
Calippe B	page 12	Deynoux M	page 17	Troubat R	page 94
Doz-Debauwe E	page 13	Dolly A	page 45	Vergès V	page 54
Da Silva M	page 14	Dreneau J	page 59	Wacquiez A	page 68
Lefort C	page 15	Elabbouchi A	page 75	Wartenberg M	page 55
Valayer A	page 16	Elleuch F	page 76		
Muller S	page 17	Faarasse F	page 77		
De Rocquigny H	page 18	Fayad S	page 78		
Bonnet C	page 19	Felgerolle C	page 79		
Michoux F	page 20	Fontaine D	page 46		
Werck D	page 21	Garrido D	page 60		
Casas Mora A	page 22	Ghazi Ayari M	page 80		
Fayad S	page 23	Grandchamp A	page 89		
Hafri M	page 24	Guimard C	page 81		
Pegard M	page 25	Jaszczyk J	page 82		
Kraïmi N	page 26	Kakwata-Deluce N	page 61		
Tahir S	page 27	Kouba S	page 47		
Luche H	page 28	Laboute T	page 90		
Drezen JM	page 29	Largillière J	page 83		
		Le TN	page 84		
		Mambu J	page 62		
		Marlet J	page 63		
		Mathiron AGE	page 91		
		Mellouk N	page 92		
		Miloudi L (PA12)	page 48		
		Miloudi L (PA13)	Page 49		
		Moreau K	page 85		
		Nadiras C	page 86		
		Nicolosi AF	page 64		
		Oyallon B	page 96		
		Pastuszka A	page 65		
		Piollet M	page 66		
		K. Plé	page 97		
		Poisson L	page 50		

JEUDI 12 Octobre 2017

- 8h30**
8h50 - 9h30 **Accueil des participants**
Ouverture du Colloque - Session académique
Hélène BENEDETTI, *Présidente de Biotechnocentre*
Anne BESNIER, *Vice-Présidente déléguée à l'enseignement supérieur et à la recherche du Conseil Régional Centre-Val de Loire*
- SESSION 1**
- 9h30 - 10h10** **Jean-Louis MERGNY**, *IECB, CNRS-INSERM-Université de Bordeaux*
Conformations inhabituelles des acides nucléiques
- 10h10 - 10h30** **Bertrand CASTAING**, *CBM, UPR4301 CNRS, Orléans*
Modulation de l'activité des ADN glycosylases et applications connexes.
(Projet MAAC2, Contrat Région Centre-Val de Loire)
- 10h30 - 11h10** **Dominique ROLIN**, *BFP, UMR1332 INRA-Université de Bordeaux*
La métabolomique en 2017: comment les communautés françaises relèvent-elles les challenges technologiques
- 11h10 - 11h30** **Pause café**
- SESSION 2 Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549**
- 11h 30 - 11h45** Filière A: **Cindy MAUREL**, *UMR INSERM U930, Université François-Rabelais, Tours*
L'inhibition de la SUMOylation réduit la formation des agrégats TDP43 positifs dans le cytoplasme de modèles in vitro de la SLA
- 11h45 - 12h00** Filière A: **Sandy FIGIEL**, *Inserm U1069, Université François-Rabelais, Tours*
Effets des acides gras polyinsaturés sur la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate
- 12h00 - 12h15** Filière A: **Farah KOUZI**, *CNRS UMR 7292, LNOx team, Université François-Rabelais, Tours*
Gap jonctions dans la niche leucémique
- 12h15 - 14h00** **Photo du groupe et Repas**
- SESSION 3**
- 14h00 - 14h30** **Bertrand CALIPPE**, *GICC, UMR7292 CNRS-Université de Tours*
L'immunosuppression dans la DMLA : un nouvel axe thérapeutique
- 14h30 - 14h50** **Emilie DOZ-DEBLAUWE**, *ISP, UMR INRA-Université de Tours*
Aérosolthérapie anti-granulocytaire pour le contrôle des pathologies inflammatoires du poumon. (Projet AGIP, Contrat Région Centre-Val de Loire)
- 14h50 - 15h20** **Assemblées Générales**
- SESSION 4 Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549**
- 15h20 - 15h35** Filière A: **Mylène DA SILVA** *INRA, UR83 Recherches Avicoles, Nouzilly*
L'implication du liquide amniotique dans la défense de l'embryon d'oiseau face aux pathogènes
- 15h35 - 15h50** Filière B: **Claudie LEFORT**, *E.A4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes, Univ. F. Rabelais Tours*
Stimulation Of P2Y11 Receptor Modulates Cardiac Fibroblasts Secretome Towards Immunomodulatory And Protective Roles After Simulated Ischemia/Reperfusion Injury
- 15h50 - 16h05** Filière B: **Alexandre VALAYER**, *Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), Inserm U1100, Université F.-Rabelais, Tours*
Effet immunomodulateur des protéases du neutrophile sur les cellules NK « Natural-Killer »
- 16h05 - 16h25** **Pause café**
- SESSION 5**
- 16h25 - 17h05** **Sylviane MULLER**, *ICT, UPR3572 CNRS, IBMC, Strasbourg*
Traitement peptidique des maladies autoimmunes inflammatoires
- 17h05 - 19h00** **Session POSTER**
- 19h00 - 19h15** **Accueil des anciens présidents de Biotechnocentre pour le 30^e anniversaire**
- 19h15 - 20h00** **Présentation par Marc RIDEAU et Hervé WATIER des « Scientifiques Célèbres de Touraine »**
- 20h00** **Repas et Soirée Biotechnocentre**

VENDREDI 13 Octobre 2017

SESSION 6

- 9h00 - 9h30** **Hugues DE ROCQUIGNY**, *Eq. MAVIVH, UMR966 INSERM, Tours*
Traffic intracellulaire de la protéine GAG du VIH-1 et interaction avec ses partenaires
- 9h30 - 10h00** **Célia BONNET**, *CBM, UPR4301 CNRS, Orléans*
Agents de contraste "intelligents" à base de Lanthanide(III) pour l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire
- 10h00 - 10h20** **Franck MICHOUX**, *« Evonik Advanced Botanicals » Evry*
Sustainable production of innovative active ingredients for the personal care industry
- 10h20 - 11h00** **Danièle WERCK**, *IBMP, CNRS, Strasbourg*
Cytochromes P450 : support à la découverte du métabolisme végétal et de son évolution
- 11h00 -11h20** **Pause-café**

SESSION 7 Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549 :

- 11h20 - 11h35** Filière C : **Alba CASAS MORA**, *CBM, UPR4301 CNRS, Orléans*
A promising N-terminal linker to simplify the synthesis of disulphide-rich peptides
- 11h35 - 11h50** Filière C : **Syntia FAYAD**, *ICOA, UMR 7311 CNRS-Université d'Orléans*
Les grandes algues marines : source de molécules bioactives pour le bien-être de la peau
- 11h50 - 12h05** Filière C : **Mohamed HAFRI**, *Laboratoire I3MTO Université d'Orléans*
Segmentation de l'os corticale et analyse de texture pour la prédiction des fractures ostéoporotiques
- 12h05 - 13h45** **Repas**

SESSION 8 Présentations de l'Ecole Doctorale SSBCV 549 :

- 13h45 - 14h00** Filière C : **Marie PEGARD**, *UR588 AGPF - Inra - Val de Loire – Ardon, Orléans*
Nouveaux modèles pour la mise en œuvre de l'évaluation pan-génomique dans le programme d'amélioration des peupliers
- 14h00 - 14h15** Filière D : **Narjis KRAIMI**, *UMR PRC, Equipe « Comportement, Neurobiologie, Adaptation », Nouzilly*
Influence du microbiote intestinal initial sur les comportements émotionnels de la caille japonaise (Coturnix japonica)
- 14h15 - 14h30** Filière D : **Shifa TAHIR**, *PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, Nouzilly*
In Silico Structural Homology Modeling and Docking of Antibodies

SESSION 9

- 14h30 - 15h10** **Hervé LUCHE**, *CIPHE, Inserm (US012), CNRS (UMS3367), Aix-Marseille Université*
La cytométrie de masse dans l'ère phénomique: un outil essentiel pour l'étude fonctionnelle des gènes
- 15h10 - 15h40** **Jean-Michel DREZEN**, *JRBI, UMR7261 CNRS-Université de Tours*
Biotechnologies ancestrales : utilisations récurrentes de virus par les guêpes parasites pour délivrer des molécules de virulence
- 15h40** **CLOTURE et REMISE DES PRIX par les fondateurs de Biotechnocentre**