



Congrès de la Section 28 du Comité National de la Recherche Scientifique

Pharmacologie, bio-ingénierie, imagerie, biotechnologie

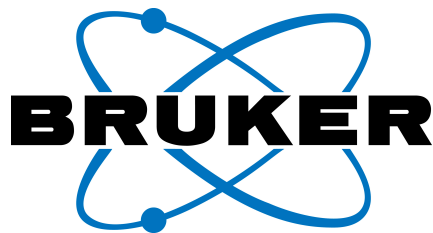
les 2 et 3 Juin 2016 à Bordeaux

Livre des Résumés

Sponsors

Nous remercions chaleureusement l'ensemble des sponsors pour leur soutien financier au colloque de la section 28 « Pharmacologie, bio-ingénierie, imagerie, biotechnologie ».

SIEMENS



CliniSciences



université
de **BORDEAUX**

Thématique

« Identification des cibles et pharmacologie »

Early and longterm neurovascular unit dysfunctions are corrected by JNK inhibition after juvenile traumatic brain injury.

D.O. Ajao¹, D.W. Sorensen^{1,2}, J.E. Kamper³, R.E. Hartman³, L. Hirt⁴, A. Obenaus¹ and J. Badaut^{1,5}

¹Department of Physiology, ²Department of Pediatrics, ³Department of Psychology, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92354, USA, ⁴Département de Neurologie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland, ⁵CNRS UMR5287, INCIA, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Background: Juvenile Traumatic Brain Injury (jTBI) can alter interactions between endothelial cells, smooth muscles and neurons (NVU) resulting in long-term changes in several motor and cognitive outcomes. In this study, we evaluated the effects of an early injection with a c-jun terminal kinase inhibitor (D-JNKI) on these outcomes after jTBI.

Methods: A single jTBI at post-natal day 17 in male rats was delivered via a controlled cortical impact to the right parietal cortex (2.7mm-diameter impactor tip, 1.5mm depth, impact coordinates: 3mm posterior, 4mm lateral to Bregma). The jTBI animals received either an intraperitoneal injection of D-JNKI (11mg/kg) or saline at 3h post-TBI. Lesion volumes at 1, 3, 7, 30, and 60 days post-injury (dpi) were quantified using T2-weighted magnetic resonance imaging (MRI). Cerebral blood flow (CBF) measurements were conducted at 60 dpi with MRI perfusion weighted imaging (PWI). Motor function and neurobehavioral outcomes were measured at 1, 3, 7, 30, and 60 dpi using foot-fault, rotor rod, open field, Morris water maze (MWM), zero maze and turn bias. Brain tissue was collected at 3 and 60 dpi for immunohistochemical studies or western blots. *In vitro*, immortalized human cerebral microvascular endothelial cells (iHCMECs) were treated with anisomycin (30ng/ml) to activate the JNK pathway. Outcomes of iHCMEC experiments were assessed at 24h by western blots.

Results: D-JNKI treated rats showed significant improvement in neurological tests over a 60-day period (e.g. for foot-fault: $p < 0.05$ until 60dpi. In MWM probe, D-JNKI treated rats spent more time in target quadrant ($p < 0.05$). This suggests improvement in spatial memory for D-JNKI treated rats at 30dpi. This result was extended to 60dpi when D-JNKI treated animals performed better on cued MWM ($p < 0.05$). Saline treated rats displayed a turn bias, showing asymmetry of motor function ($p < 0.05$) that was reversed by D-JNKI treatment. T2 values in the lesioned cortex were reduced in the D-JNKI group at 3 and 7dpi indicating that D-JNKI treatment attenuates edema formation after jTBI. Lesion volumes were significantly reduced in D-JNKI treated rats versus saline over 60dpi. jTBI activated the JNK pathway via phosphorylation of the JNK pathway at 3dpi ($p < 0.05$). Phosphorylation of JNK was observed in Endothelial Cells and Neurons in the brain. *In vitro*, anisomycin application in the iHCMECs activated the JNK pathway via phosphorylation of JNK at 24h. Anisomycin treatment in iHCMECs was associated with decreased Claudin 5 and P-gp at 24h. *In vivo*, early Blood-Brain Barrier (BBB) disruption was significantly attenuated in D-JNKI treated rats as determined by decreased immunoglobulin G (IgG) ($p < 0.05$), suggesting that early BBB opening is decreased by D-JNKI treatment. At 3dpi, Claudin 5, P-gp and phosphorylation of eNOS were increased following D-JNKI treatment ($p < 0.05$) suggesting improvement of the BBB phenotype. Interestingly, these increases in Claudin 5, P-gp and phosphorylation of eNOS were no longer present at 60dpi. Increased intensity of Smooth Muscle Actin (SMA) in D-JNKI treated group at both 3dpi and 60dpi with increased of blood vessel diameters measured from Lectin-staining at 60dpi indicates long-term improvement of the vascular network. This morphological changes are associated with significant increase of the CBF in DJNKI-treated rats at 60 dpi measured from PWI.

Conclusions: These results show that a single dose of D-JNKI administered at 3 hours post-injury in juvenile rats' effects a reduction in lesion volume and improvements in several motor and cognitive functions. Early BBB changes that occur after jTBI are corrected after D-JNKI treatment. Our *in vitro* data suggest that JNK activation can result in changes in the phenotype of cerebral endothelial cells. *In vivo*, our correction of phenotypic changes in endothelial cells and improvement in smooth muscle with D-JNKI treatment suggests that the JNK pathway is a potential target for treatment of jTBI. Our work also highlights that neuronal and neurobehavioral improvement with D-JNKI might be occurring by strengthening the vascular network.

Acknowledgements: Funded by: NIH 1R01HD061946-01, EraNet Neuron CNS-Aflame (JB)

Off-target effects of aquaporin 4 RNA interference on connexin 43 expression via changes of microRNA expression: Consequences on neuroimaging and astrocyte gap- junctions

A. Jullienne¹, A. M Fukuda², A. Ikova³, N. Nishiyama², J. Coats¹, S. S Bertrand³, A. Obenaus¹, J. Badaut^{2,3}

¹Department of Pediatrics, ²Department of Physiology, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92354, USA, ³CNRS UMR-5287, 33076 Bordeaux, France

Background: Water movement in the brain is critical for cellular function by regulating cell volume, and homeostasis within extracellular and intracellular compartments. We previously showed a 27% decrease in the expression of the water channel, aquaporin 4 (AQP4), after intracortical injection of siRNA targeting AQP4 (siAQP4) in rat wherein water mobility was decreased by 50% within the cortex. It has also been previously reported that siAQP4 also resulted in a decreased expression of the gap junction protein connexin 43 (Cx43) in primary astrocyte cultures. Interestingly, the absence of Cx43 and Cx30 modifies the distribution of AQP4 in astrocytic endfeet.

MicroRNA (miRNA) are small (21-22 nucleotides) noncoding RNA, which have regulatory activities in animals. Several miRNAs target both AQP4 and Cx43 messenger RNA and may regulate simultaneously the level of expression of AQP4 and CX43. We hypothesized that the off-target effects of siAQP4 on Cx43 expression occur via modifications of expression of miRNA targeting both proteins.

Methods: P17 rats were intracortically injected with siAQP4, siCx43 or siGLO (control), on days 0 and 2. On day 3, animals were euthanized after T2WI, DWI and Diffusion Tensor Imaging (DTI) scans. Animals were used for protein assessment (western blot and immunohistochemistry) and for miRNA assessment (PCR). To determine miRNA targeting both AQP4 and Cx43 we used both literature and database searches (targetscan.org and microrna.org). We selected 6 miRNA (miR19a, miR23a, miR130a, miR224, miR381, miR384) that were the most conserved between species.

Primary astrocyte cultures were prepared and transfected with siAQP4 to assess by western blot the effects on Cx43 expression and quantitative RT-PCR for miRNA expression. Astrocytes are connected with gap-junctions. The effects of CX43 changes on the gap-junctions were tested by intracellular injection of Lucifer yellow (LY) in one astrocyte and measurement of LY fluorescence diffusion through these gap-junctions.

Results: Western blot and immunohistochemistry showed that siAQP4 injection indeed resulted in decreased levels of Cx43 *in vivo* compared to siGLO-injected rats and a 50% decrease in water mobility (DWI). Injection of siAQP4 also induced major changes in DTI parameters with a 12% decrease in radial diffusion and 20% increase in relative anisotropy in the parietal cortex. In contrast, injection of siCx43 did not alter AQP4 levels and no changes in T2WI or DWI were observed. The decreased expression of Cx43 in siAQP4 treated animals relative to controls was associated with a 40% up-regulation of miR224. In contrast, siCX43 induced a decrease of miR224. The consequences of the decrease of Cx43 on astrocyte gap-junctions are now under evaluation using astrocyte cultures, where we observed a decrease of Cx43 following application of siAQP4.

Discussion: The increased miRNA expression could be a molecular mechanism explaining in part the effects of siAQP4 on Cx43 expression. Decreased CX43 is not sufficient to induce changes in brain water mobility; AQP4 decreases are mandatory to drive the reduction in water mobility. Moreover, AQP4 can actively modulate the directionality of water diffusion in the cortex, suggesting a role of the astrocyte in changes of DTI signals in grey matter.

Acknowledgements: This study was supported by a grant from the National Institute of Health NINDS R01HD061946 and The Swiss National Science Foundation (Jérôme Badaut).

Prise en charge de la douleur chez les patients sous antivitamines K

Amina Bayazid^{1,2}, Habiba Fetati², Houari Toumi²

¹Faculté de médecine de Sidi Bel Abbas , Algérie, ²Service de pharmacovigilance, Etablissement Hospitalo-Universitaire d'Oran , Algérie.

Introduction : L'intérêt clinique des antivitamines K (AVK) a largement été démontré dans de nombreuses indications. Malheureusement, les AVK ne sont pas dépourvus d'inconvénients et de risque d'hémorragie grave. L'iatrogénie induite par ces molécules représente un grand problème de santé publique.

Objectifs : Patients et méthode : Nous avons réalisé une étude rétrospective sur période s'étalant de Février 2012 à Aout 2013 au service de pharmacovigilance de l'EHUO (unité de pharmacologie clinique). La prescription des antalgiques a été analysée chez les patients sous AVK suivis à notre niveau. L'influence de ces antalgiques sur l'évolution de l'INR consiste un volet important dans notre travail.

Résultats : Nous avons compté au total 195 patients, parmi lesquels 32 (soit 16,41% de la population totale) avaient reçu un traitement antalgique.

La fréquence des différentes catégories d'antalgiques administrés était :

- Les antalgiques opioïdes forts : 0%,
- Les antalgiques opioïdes faibles : Tramadol :21,87 %,
- Les antalgiques non opioïdes : -AINS : 71,87% (indométacine : 68,75%,Ibuprofène :3,12%)
- Paracétamol : 6,25 %
- Salicylés (acide acétyl salicylique) : 0 %

Nous avons constaté que les courbes d'évolution des INR des patients sous AINS et tramadol était gravement perturbées alors que ceci aurait pu être évité en les remplaçant par d'autres antalgiques qui n'interfèrent pas avec les AVK.

Conclusion : La prise en charge de la douleur chez les patients sous AVK présente des particularités, vu leurs nombreuses interactions médicamenteuses avec les antalgiques et leur influence sur l'évolution de l'INR, pouvant avoir des conséquences dramatiques engageant le pronostic vital. En tant que telle, une attention particulière doit être portée à l'utilisation des antalgiques chez ce type de patient.

Intérêt du lactate dans la prévention des lésions hypoxiques- ischémiques néonatales : une étude pré-clinique chez le raton nouveau-né.

L.Mazuel¹, G.Raffard¹, S.Sanchez¹, J.-M. Franconi¹, J.-F.Chateil¹, A-K.Bouzier-Sore¹

¹ Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS/Université Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Contexte : Longtemps considéré comme un produit final du métabolisme, le lactate se révèle avoir un rôle beaucoup plus important. Des données accumulées au cours de ces 20 dernières années ont montré que le lactate était un substrat énergétique neuronal. Plus récemment, il a été découvert un récepteur au lactate dans le cerveau (GPR81) suggérant un rôle potentiel en tant que molécule signal. La capacité du cerveau à utiliser le lactate en tant que substrat énergétique a été montrée chez l'homme lors de lésions cérébrales traumatiques. L'objectif de cette étude est de tester l'effet neuroprotecteur du lactate dans un modèle d'hypoxie-ischémie (HI) chez le rat nouveau-né.

Matériel et méthode : L'induction de l'HI cérébrale a été réalisée chez des rats Wistar nouveau-nés (P7) (n=15) selon le modèle de Vannucci (2h à 31°C, 8% O₂) Les animaux ont ensuite reçus soit une injection intra-péritonéale de lactate (groupe HI-L ; n=8), soit de NaCl 0,9% (groupe contrôle HI-C ; n=7) soit de lactate et d'inhibiteur de la LDH (Oxamate) (groupe HI-LO ; n=8). Une IRM de diffusion a été réalisée 3h après la ligature à 4.7T (Bruker Biospec[®] 47/20-USR, TE=24ms, TR=2s, 30 directions, 20 coupes de 1mm). L'analyse des données a été réalisée sous Paravision 6.0, par deux opérateurs indépendants (variabilité intra-opérateur<1% ; variabilité inter-opérateur<5%). Pour chaque animal, le volume de la lésion, le coefficient de diffusion apparent (ADC) et la valeur de la fraction d'anisotropie (FA) ont été mesurés.

Résultats: Les animaux du groupe HI-L présentent une diminution significative du volume de la lésion ischémique comparé aux individus du groupe HI-C (1,76±0,43 vs. 2,34±0,43 cm³; p<0,05) soit une diminution de près de 32% de la taille moyenne de la lésion. L'ADC mesuré observé dans la zone lésée présente une valeur significativement supérieure chez les animaux HI-L comparé aux animaux HI-C (0,504±0,03 vs. 0,459±0,02mm²/s ; p<0,01). En comparaison avec des valeurs obtenues sur des animaux témoins, le pourcentage de variation de l'ADC pour le groupe HI-L est réduit à 34% contre 40% pour le groupe HI-C. De façon intéressante, l'inhibition de l'utilisation du lactate (groupe HI-LO) supprime l'effet neuroprotecteur et aggrave le phénotype à 48h.

Discussion: Dans un modèle d'HI néonatale, l'administration de lactate après l'accident ischémique permet une réduction significative de la taille des lésions, et ce dès 30 min après l'injection. Des valeurs plus élevées de l'ADC sont observées chez les animaux HI-L, suggérant une réduction de l'œdème cytotoxique. L'inhibition de l'utilisation du lactate supprime l'effet neuroprotecteur suggérant ainsi un rôle protecteur du lactate endogène. Ces résultats préliminaires montrent un effet neuroprotecteur précoce du lactate dans le contexte d'une HI néonatale.

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt concernant ce travail.

Détermination de la séquence minimale active de la tétrastatine (matrikine anti-tumorale) et étude de son interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

E. Lambert¹, K. Benfatma¹, B. Brassart¹, M. Dauchez¹, J-C. Monboissee¹, F-X. Maquart¹, S. Baud¹,
et S. Brassart-Pasco¹

¹UMR CNRS/URCA 7369 (MEDyC), Reims

Résumé : Au cours de la progression tumorale, la dégradation de la matrice extracellulaire par les protéases libère des fragments bio-actifs nommés matrikines. Parmi ces matrikines, le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4$ de collagène IV ou tétrastatine, inhibe la prolifération, l'invasion de cellules de mélanome *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* via son interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La séquence de 226 acides aminés de la tétrastatine a été découpée en différents peptides dont l'activité a été testée *in vitro* (prolifération, migration, invasion) et *in vivo* (modèle de mélanome murin). La séquence minimale active identifiée à ce jour comporte 13 acides aminés (QS-13). Des expériences de docking moléculaire du QS-13 sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont conduit à l'identification de cinq sites de liaison privilégiés, dont un chevauchant le site de fixation du peptide RGD. La préincubation des cellules avec le peptide RGD inhibe de 40% leur adhésion sur le peptide QS-13, ce qui conforte l'implication d'un site très proche de celui fixant RGD. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée dans des tumeurs, notamment le mélanome, alors qu'elle est peu exprimée dans les conditions physiologiques. La fonctionnalisation de nanoparticules avec le peptide QS-13 devrait permettre de cibler les tumeurs, permettant au QS-13 d'exercer son effet anti-tumoral propre mais également de délivrer *in situ* d'autres agents thérapeutiques encapsulés dans ces nanoparticules.

GLYCOSAMINOGLYCAN PROFILING IN DIFFERENT CELL TYPES USING RAMAN SPECTROSCOPY

S. Brézillon^{1,2,*}, V. Untereiner^{2,3,4}, J. Hodin^{1,2,3}, A-C. Colliet^{1,3}, F-X. Maquart^{1,2,5}, Y. Wegrowski^{1,2}, G. D. Sockalingum^{1,2,3,*}

¹CNRS UMR7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC. ²Université de Reims Champagne-Ardenne, Laboratoire de Biochimie médicale et de Biologie Moléculaire, UFR de Médecine.

³MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, UFR de Pharmacie. ⁴Plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire (PICT), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. ⁵CHU de Reims, Laboratoire Central de Biochimie, Reims, France.

Background: Spectroscopic markers characteristic of reference glycosaminoglycan (GAG) molecules have been identified previously based on their molecular structures by Raman and infrared (IR) microspectroscopies (1, 2). IR spectral signatures of GAG in complex biological systems like cells were also recently demonstrated (3). However, IR microspectroscopy is limited in terms of spatial resolution and also requires sample drying. In order to study live cells, Raman microspectroscopy is potentially interesting to perform studies in physiological conditions.

Aim: To identify the Raman spectral signatures of GAG in live cells.

Materials and Methods: Biochemical and Raman spectral analyses were performed from five cell types: dermal fibroblasts, melanoma cells, chondrocytes, wild type CHO cells, and GAGs defective mutant CHO-745 cells, as well as their respective conditioned media.

Results: Biochemical characterization of GAGs was confirmed by principal component analysis (PCA) of the different cell type spectra and showed that the Raman technique is sensitive enough to distinguish the conditioned media of the five cell types. The results were confirmed at the single cell level on both live and fixed cells. Principal component analysis (PCA) demonstrated the prominence of the information related to GAGs.

Discussion: Raman microspectroscopy allows to monitor GAG profiles of five cell types at the single live cell level. Raman microspectroscopy could therefore be developed for cell screening purposes and further for identifying GAG molecules in tissues. In addition, in a mid-term perspective, in vivo Raman spectroscopy could be developed to search for GAG spectral signatures in peritumoral margins of certain tumors as a marker of tumor progression.

References : 1. N.Mainreck, S.Brézillon, GD.Sockalingum, F-X. Maquart, M.Manfait, Y.Wegrowski, J Pharm. Sci., 2011, 100, 441. 2. N.Mainreck, S.Brézillon, GD.Sockalingum, F-X. Maquart, M.Manfait, Y.Wegrowski, Meth. Mol. Biol. 2012, 836, 117. 3. S.Brézillon, V.Untereiner, L.Lovergne, I.Tadeo, R.Noguera, F-X.Maquart, Y.Wegrowski, GD.Sockalingum, Anal. Bioanal. Chem, 2014, 406, 5795.

Fourier transform infrared microspectroscopy and imaging of non-inflammatory and inflammatory breast cancer cell lines and tissues: glycosaminoglycans as potential spectral markers?

H.T. Mohamed^{1,2,3}, G.D. Sockalingum^{1,2,4}, V. Untereiner^{2,4,5}, M. El-Shinawi⁶, S.A. Ibrahim³, M. Götte⁷, F-X. Maquart^{1,2,8}, M.M. Mohamed³ and S. Brézillon^{1,2}

¹CNRS UMR7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique cellulaire, MEDyC. ²Université de Reims Champagne-Ardenne, Laboratoire de Biochimie médicale et de Biologie Moléculaire, UFR de Médecine. ³Department of Zoology, Faculty of Science, Cairo University, Egypt. ⁴MeDIAN-Biophotonique et Technologies pour la santé, UFR de Pharmacie. ⁵Plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire (PICT), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. ⁶Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Egypt. ⁷Department of Gynecology and Obstetrics, Münster University Hospital, Münster, Germany. ⁸CHU de Reims, Laboratoire Central de Biochimie, Reims, France.

Introduction: Inflammatory breast cancer (IBC) is the most lethal form of breast cancer. Late diagnosis of IBC is the leading cause of poor prognosis due to lack of specific biomarkers. Fourier- transform infrared (FTIR) microspectroscopy and imaging can be used as label-free approach to detect the early modifications caused by cancer cells due to their capacity to detect any biochemical changes before any histological changes. Glycosaminoglycans (GAGs) play an important role in breast cancer progression. Their structure and content were found to be different in normal and cancer cells and even between different cancer cell types. Previously, we identified the infrared spectral signatures of standard GAGs and differentiated cell types based on their capacity of GAG synthesis.

Aim: The aim of the present work was to differentiate between non-IBC and IBC cell lines and tissues using FTIR microspectroscopy and imaging based on GAG spectral contribution.

Materials and Methods: Four human breast cancer cell lines, MDA-MB-231, SK-BR3 and MCF-7 (non-IBC) and SUM-149 (IBC) were used in this study as well as their respective conditioned media. Cells were analyzed as suspensions and as single isolated cells using FTIR microspectroscopy and imaging, respectively. Extracted GAGs from conditioned media were also analyzed. A total of 20 breast cancer patients (10 non-IBC and 10 IBC) and 3 healthy volunteers from Ain Shams University hospital in Egypt were enrolled in this study after signing consent form. Breast carcinoma and normal breast tissues from healthy volunteers were collected during modified radical mastectomy surgery and during breast reduction surgery, respectively. Breast tissues were analyzed using FTIR imaging. Cell data were analyzed by exploratory unsupervised chemometric methods based on hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Tissue images were pre-processed and analyzed using common K-Means and Fuzzy C-Means Cluster-Algorithms.

Results: HCA and PCA analysis of GAG spectra of different breast cancer cell line conditioned media showed low intra-group variability and high inter-group variability enabling us to differentiate between higher and lower invasive and metastatic cell lines. Moreover, non-IBC and IBC cell line conditioned media were differentiated. In the same manner, HCA and PCA analysis of GAG spectra obtained from different breast cancer cell lines showed low intra-group variability and high inter- group variability sufficient to distinguish between different breast cancer cell lines and also between non-IBC and IBC cell types. Breast tissue analysis, by common K-Means and Fuzzy C-Means Cluster-Algorithms, allowed firstly to discriminate between healthy tissues and breast carcinoma, and secondly to distinguish non-IBC and IBC tissues. Adjacent normal tissues surrounding tumor mass were different in both breast cancer types in comparison with healthy tissues.

Conclusion: Our study demonstrates that FTIR microspectroscopy/Imaging has the potential to discriminate between healthy and cancer tissues but more importantly between non-IBC and IBC at both cell lines and tissues based on GAG spectral contribution.

Contrôle de la fidélité de la réparation des cassures de l'ADN par le remodeleur de la chromatine p400 ATPase

Taty-Taty, GC¹; Chailleux, C¹; Quaranta, M¹; So, AY²; Guirouilh-Barbat, J²; Lopez, BS²; Bertrand, P³; Trouche, D¹ et Canitrot, Y¹.

¹LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France ²Université Paris Sud, CNRS UMR8200, IGR, Villejuif, France ³CEA DSV, UMR 967 CEA-INSERM-Université Paris Diderot-Université Paris Sud, Fontenay aux roses, France

Résumé: Les cassures d'ADN double-brin sont des dommages très délétères pour les cellules qui peuvent conduire à la mort cellulaire mais aussi à la génération d'anomalies chromosomiques. La réparation de ces dommages se fait grâce à deux mécanismes principaux qui sont la recombinaison homologue et la jonction des extrémités (NHEJ). La qualité de cette réparation doit également être contrôlée afin d'éviter l'apparition d'instabilité génétique. Cependant, certaines voies de réparation comme la jonction alternative des extrémités (alt EJ) sont connues pour générer des anomalies lors de leur utilisation. Lors de ces travaux nous avons montré que cette voie de réparation particulière était contrôlée par le remodeleur de chromatine p400 ATPase. L'ATPase p400 agit comme un frein à l'utilisation de la voie (altEJ). Lorsque le niveau de p400 est diminué on observe l'apparition de grandes délétions au niveau des cassures d'ADN réparées, signature d'une instabilité génétique importante. La déplétion de p400 entraîne également le recrutement de la poly(ADP) ribose polymérase (PARP) au niveau des cassures ce qui a pour conséquence de provoquer une hypersensibilité des cellules aux inhibiteurs de cette enzyme. Dans ce cas il pourrait être envisagé de tuer sélectivement les cellules qui utilisent la voie de réparation AltEJ qui provoque de l'instabilité génétique et ainsi éliminer sélectivement ces cellules.

Thrombospondin1 is a double-edged sword for tumor infiltration and angiogenesis in glioblastoma

T. Daubon^{1,2}, C. Leon¹, K. Clarke³, F. Falciani³, R. Bjerkgvig² and A. Bikfalvi¹

¹INSERM U1029, University Bordeaux, 33 615 Pessac, France; ²NorLux Neuro-Oncology, Department of Biomedicine, University of Bergen, Jonas Lies vei 91, 5019 Bergen, Norway ; ³Centre for Computational Biology and Modelling (CCBM), Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK.

Introduction: Glioblastoma are heterogeneous tumours composed of different subpopulations of cells with different behavioral characteristics. Areas of highly angiogenic cells co-exist with populations of non-angiogenic but highly invasive and infiltrative cells. This heterogeneity is a key clinical challenge in glioma treatment.

We used a large scale RNA sequencing approach to investigate the molecular components which differentiate infiltrative from angiogenic cells, in a Patient Derived Xenograft (PDX) mouse model. Our bioinformatic analysis revealed TGFb to be a master regulator of tumor development, and Thrombospondin-1 (Tsp1) to be up regulated in infiltrative areas as compared to angiogenic area. Thrombospondins are known as anti-angiogenic factors, however the full roles of these multi domain proteins in tumor development remain to be elucidated.

Results: We found Tsp1 expression to be upregulated in grade IV-GBM and in silico in the GBM mesenchymal subclass. It is expressed not only in tumor cells, but also in tumor blood vessel endothelial cells (ECs). TGFb1 transcriptionally regulated Tsp1 via Smad1 and Smad3. However, contrary to previous results, we found that Tsp1 was not involved in TGFb1-activation in tumor cells. We showed that Tsp1 regulates cell migration and invasion both in vitro and in vivo. Inhibition of Tsp1 expression in vivo correlated with increased tumor vascularization in both the chick CAM assay and the PDX mouse model.

Discussion: Anti-angiogenic treatments in the PDX mouse model leads to increased tumor hypoxia and invasive tumor cell behavior, as described in our previous work. In this context, both TGFb1 and Tsp1 were upregulated in tumor cells. Downregulation of tumor-derived Tsp1 by shRNA in the presence of anti-angiogenic therapy led to reduced tumor growth and invasion in vivo. Finally, peptide-mediated inhibition of Tsp1 activity demonstrated that Tsp1/CD47 interaction is involved in the invasive capacity of GBM cells.

Conclusion: Taken together, our data suggest that Tsp1 inhibition may be a promising therapeutic approach to limit tumor infiltration induced by treatment with anti-angiogenic agents.

La thrombine et son récepteur PAR-1 comme cibles thérapeutiques pour traiter le remodelage du myocarde auriculaire

C. Jumeau¹, A. Rupin², N. Villeneuve²,
N. Mougenot³, S. Hatem¹, M. David-Dufilho¹.

¹UMRS-1166 Inserm-UPMC - Paris, ²Institut de recherche Servier - Suresnes, ³UMS28 Inserm-Sorbonnes-Universités - Paris

Résumé : La fibrillation atriale (FA) est l'arythmie cardiaque la plus fréquente. La FA est souvent associée à d'autres pathologies cardiovasculaires comme les pathologies mitrales, l'insuffisance cardiaque congestive, l'hypertension, la coronaropathie, l'hyperlipidémie ou le diabète. La FA se caractérise par une contraction désorganisée des oreillettes associée à une dilatation atriale et un état d'hypercoagulabilité résultant d'une dysfonction endothéliale. Sa prévalence augmente avec l'âge et sa complication majeure est le thromboembolisme, notamment les accidents vasculaires cérébraux. La prévention des accidents thromboemboliques est donc un enjeu capital dans la prise en charge de la FA. Elle se fait par prescription d'anticoagulants oraux standards comme les anti-vitamines K (AVK) ou d'anticoagulants oraux directs en première intention (inhibiteurs du facteur Xa, de la thrombine). La thrombine est non seulement le facteur IIa qui catalyse l'étape ultime de la cascade de la coagulation, c'est aussi un activateur des récepteurs PAR (*Protease activated receptor*), et plus spécifiquement du PAR-1 pour le système cardiovasculaire. Notre hypothèse est que la thrombine en excès dans les oreillettes faiblement contractiles participe à la dysfonction endothéliale et au remodelage structurel myocardique qui conduit à la dilatation atriale, par activation du PAR-1.

Pour valider cette hypothèse, nous avons répondu aux deux questions suivantes :

1. Les anticoagulants oraux du groupe des inhibiteurs directs de thrombine (IDT) et les antagonistes du PAR-1 sont-ils capables de réduire le remodelage atrial ?

2. Quelle voie de signalisation de la thrombine est impliquée dans le remodelage atrial ?

Nous avons utilisé un modèle de dilatation atriale associée à une insuffisance cardiaque qui est provoquée par un infarctus du myocarde (IM) chez le rat. Ce modèle est caractérisé par un état d'hypercoagulabilité qui perdure 2 mois post-IM et une susceptibilité accrue à l'arythmie.

Les rats ont été traités avec un IDT à usage thérapeutique (dabigatran etexilate), un IDT expérimental synthétisé par les laboratoires Servier (S35972), un AVK (warfarin) ou un antagoniste PAR-1 (F16618).

L'administration de dabigatran etexilate ou de S35972 pendant 1 mois post-IM réduit la dilatation atriale tandis que le warfarin n'a pas d'effet. Après 2 mois de traitement, l'IDT S35972 et l'antagoniste du PAR-1 F16618 préviennent la dilatation atriale avec un petit effet réducteur sur le diamètre du ventricule gauche mais sans amélioration de la fonction ventriculaire. Le S35972 réduit aussi la susceptibilité arythmique de l'oreillette gauche. L'action inhibitrice des IDT sur le remodelage atrial est maximale à des concentrations plasmatiques entre 30-100 nM puis diminue au-dessus tandis que leur activité anticoagulante augmente proportionnellement. La prévention de la dilatation atriale par l'IDT et antagoniste du PAR-1 est associée à une inhibition de l'induction des marqueurs de réponse hypertrophique myocytaire, β -MHC et BNP et de remodelage matriciel, PAI-1 et CTGF et une désactivation du facteur de transcription NFATc3, connu pour être activé par la calcineurine. L'utilisation de cultures d'explants d'oreillettes gauches, pour s'affranchir des autres stimuli cardiaques qui peuvent agir en synergie avec la thrombine, a permis de confirmer son activité proremodelante et de montrer l'implication de la cascade de signalisation Rho/ROCK.

Ces résultats montrent que la thrombine stimule le remodelage atrial via les voies de signalisations des protéines Rho et de calcineurine/NFAT et que les IDT ont des propriétés anti-remodelage indépendamment de leur activité anticoagulante.

Canaux ASIC et lipides dans la douleur articulaire

S. Marra^{1,2,3}, R. Ferru-Clément^{4,5}, V. Breuil⁶, A. Delaunay^{1,2,3}, M. Christin^{1,2,3}, V. Friend^{1,2,3}, S. Sebille^{4,5}, C. Cognard^{4,5}, T. Ferreira^{4,5}, C. Roux⁶, L. Euller-Ziegler⁶, J. Noel^{1,2,3}, E. Lingueglia^{1,2,3} et E. Deval^{1,2,3}

¹ CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR 7275, Valbonne, France. ; ² Université de Nice Sophia Antipolis, UMR 7275, 06560 Valbonne, France. ; ³ LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, 06560 Valbonne, France. ; ⁴ CNRS, Laboratoire de Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), ERL 7368, 86073 Poitiers Cedex 9, France. ; ⁵ Université de Poitiers, ERL 7368, 86073 Poitiers Cedex 9, France. ; ⁶ CHU-Nice, Hôpital l'Archet 1, 06200 Nice.

Résumé : De nombreuses conditions douloureuses sont associées à une acidification tissulaire. Les ASIC (Acid Sensing Ion Channels) forment une famille de canaux ioniques excitateurs exprimés dans les neurones, y compris les neurones nocicepteurs qui sont spécialisés dans la détection des stimuli douloureux. A ce jour, les protons restent les seuls activateurs endogènes connus des ASIC, et ces canaux sont classiquement considérés comme des senseurs du pH extracellulaire. A ce titre, les ASIC ont été impliqués dans le développement de différents types de douleurs chez les rongeurs, notamment les douleurs inflammatoires et postopératoires¹⁻³. Dans notre étude⁴, nous montrons que des exsudats humains issus de patients souffrants d'épanchements articulaires douloureux, sont capables d'activer un des membres de la famille ASIC, i.e., le canal ASIC3, et ce malgré un pH qui n'est pas acide. Cet effet est largement médié par les lipides contenus dans ces exsudats, et nous avons pu mettre en évidence que le LysoPhosphatidylCholine (LPC) et l'Acide Arachidonique (AA) sont de nouveaux activateurs endogènes du canal ASIC3, sans aucune acidification du milieu extracellulaire. Le LPC et/ou l'AA sont capables d'activer ASIC3 de façon constitutive, ce qui diffère de l'activation par les protons qui est plutôt transitoire. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence que la combinaison du LPC et de l'AA chez le rat (i) induit des courants dépolarisants dans les neurones sensoriels, (ii) augmente l'excitabilité des fibres C nociceptives, et (iii) provoque des comportements douloureux ; effets qui sont tous sensibles aux inhibiteurs pharmacologiques du canal ASIC3. Nous démontrons également que la douleur induite par ces 2 lipides est significativement réduite chez les souris invalidées pour le gène ASIC3. Pour conclure, nos résultats mettent pour la première fois en évidence de nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC, et ils suggèrent qu'ASIC3 pourrait être une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement des douleurs articulaires chez l'homme. Enfin, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives quant aux rôles des canaux ASIC dans la signalisation médiée par les lipides.

Références : 1. Deval, E., et al. Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J Neurosci* 31, 6059-6066 (2011). 2. Deval, E., et al. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27, 3047-3055 (2008). 3. Sluka, K.A., et al. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129, 102-112 (2007). 4. Marra, S., et al. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* 35, 414-428 (2016).

Contribution of the β 1 integrin signalling pathway to the mesenchymal invasive signature associated with melanoma resistance to targeted therapies.

Christophe A. Girard^{1,2}, Rania Benjouira^{1,2}, Charlotte Pandiani^{1,2}, Mélanie Tichet^{1,2}, Anaïs Pottier^{1,2}, Aude Mallaviale^{1,2}, Virginie Prod'homme^{1,2}, Frederic Larbret^{1,3}, Marcel Deckert^{1,2}, and Sophie Tartare-Deckert^{1,2}.

IINSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Microenvironment, Signaling and Cancer (Microcan) team, Nice, France. 2University of Nice – Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France. 3University of Nice – Sophia Antipolis, EA6302, Flow Cytometry Facility, Hôpital l'Archet 1, Nice, France.

Résumé : Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, being responsible for 80 percent of all skin cancer deaths. Its aggressiveness is mainly due to its high metastatic potential and its resistance to conventional therapies. Over the last decade, the treatment of metastatic melanoma has been revolutionized following the discovery of BRAFV600E oncogenic mutations in over 50% of all patients. The identification of this mutation, which leads to the constitutive activation of the MAP Kinase survival pathway, has led to the development of BRAFV600E specific inhibitors such as Vemurafenib or Dabrafenib. First approved for clinical use in 2011, these targeted therapies give spectacular clinical responses in about half of the patients treated. Unfortunately, within a few months patients eventually relapse due to the acquisition of resistance mechanisms. Using an in vitro model of BRAF inhibitors resistant melanoma cells, we found that resistance to targeted therapies is associated with a phenotype switching that confers to melanoma cells a mesenchymal morphology associated with increased migration, invasion, and adherence properties. Furthermore, BRAF resistant cells exhibit enhanced metastatic properties in vivo. At the biochemical level, resistant melanomas overexpress several mesenchymal markers including fibronectin as well as its main receptors β 1 integrins, and activate a pathway dependent on β 1 integrin and its main effector, the Focal Adhesion Kinase (FAK). Using pharmacological and RNA interference approaches, we demonstrate that targeting the β 1/FAK pathway affects the mesenchymal morphology of resistant cells and decreases both their adherence and migration properties. Our results provide new insights into the molecular mechanisms responsible for the phenotype switching associated with BRAF inhibitors resistance and may constitute the first step towards the development of new combinatorial therapies for metastatic melanoma.

Development of nanobodies (single domain antibodies) targeting the GABAB receptor

Julie Kniazeff, Thor Møller, Elodie Dupuis, Daniel Baty, Eric Trinquet & Jean-Philippe Pin

Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203, INSERM U1191, Université de Montpellier

Nanobodies, or single domain antibodies, are derived from the camelids immune system. They are small and stable proteins that have the ability to bind with high affinity to 3D epitopes like small cavities in proteins and to stabilize them. In agreement, they can detect and stabilize specific conformation of a given protein. In the recent years, nanobodies were reported for their application in fundamental research but also in numerous areas of the medical research both for diagnosis and therapy. In this perspective, nanobodies targeting the G protein coupled receptors (GPCRs), one of the most drugable protein families, have been developed and were shown as promising tools.

Here, we report the isolation and characterization of anti-GABAB nanobodies. The GABAB receptor belongs to the class C GPCRs and is the receptor for the main inhibitory neurotransmitter GABA. It is associated to various diseases and disorders including spasticity, alcoholism or pain. The receptor is an obligatory heterodimer composed of GABAB1 and GABAB2 subunits. After llama immunization with HEK293 cells transiently transfected with GABAB1 and GABAB2, a library of the variable region of the heavy chain of the immunoglobulins was generated. A phage-display panning on cells expressing the receptor was then performed and the isolated clones were screened for their specificity to bind to the GABAB receptor. We isolated a total of 16 unrelated nanobodies with affinity ranging from 0.2 to 200 nM. The binding domain of the different nanobodies is being addressed as well as their specificity toward specific conformation. High affinity nanobodies were derivatized with fluorophores and used for imaging in both transfected cells and neurons.

Ciblage de la voie de signalisation JAK/STAT dans le traitement du psoriasis
Myriam Lamrayah¹, Anne-Sophie Boisgard¹, Plamen Kirilov¹, Fabrice Pirot¹, Bernard Verrier¹

¹LBTI : Biologie tissulaire et Ingénierie thérapeutique - UMR 5305 – Lyon

Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique touchant l'ensemble du corps (cuir chevelu, dos, articulations) et affectant 2 à 3% de la population européenne. Cette maladie multifactorielle se caractérise par un renouvellement accéléré de l'épiderme dû à une prolifération anormale des kératinocytes. Le système immunitaire a une place prépondérante dans la physiopathologie du psoriasis via le rôle capital des cytokines inflammatoires. La chronicité du psoriasis s'explique notamment par l'activation de voies de signalisation intracellulaire qui régulent l'expression de molécules pro-inflammatoires et stimulent la prolifération kératinocytaire. La voie de signalisation principalement décrite dans le psoriasis est la voie JAK/STAT. L'inhibition ciblée de cette voie est donc un enjeu stratégique majeur dans le développement de nouvelles thérapies. Actuellement, l'arsenal thérapeutique disponible sur le marché est composé d'une part de traitements locaux à visée symptomatique d'efficacité discutable selon le stade de la maladie et d'autre part de traitements systémiques destinés aux formes sévères mais pouvant entraîner des effets indésirables. De nombreux essais cliniques internationaux sont en cours pour l'évaluation d'inhibiteurs JAK/STAT administrés par voie orale. En revanche, l'administration topique n'est encore que peu exploitée. Le développement de formes innovantes contenant des substances actives ciblant une voie de signalisation spécifique telle la voie JAK/STAT semble donc être une stratégie prometteuse pour compléter l'offre de soins.

Notre équipe « Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire » du Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (LBTI) a développé un système nanoparticulaire biodégradable à base d'acide poly (D,L lactique), capable de délivrer des agents thérapeutiques encapsulés ou adsorbés selon leurs propriétés physico-chimiques. Dans l'indication du psoriasis, nous développons des nanoparticules contenant un inhibiteur JAK/STAT destinées à une administration par voie topique pour une libération locale et contrôlée. Ce système vecteur permet de concentrer la substance active sur le site d'action souhaité (accumulation significative dans les follicules pileux et glandes sébacées), d'optimiser la stabilité des systèmes et de limiter tout effet secondaire iatrogénique.

L'objectif de ces recherches est d'élaborer une formulation semi-solide de nanoparticules de PLA contenant un inhibiteur JAK/STAT pour le traitement du psoriasis.

Cinq formulations semi-solides contenant les nanoparticules ont été élaborées et caractérisées afin de répondre au mieux aux attentes galéniques de l'étude. Pour chacune d'elles, différents tests ont été réalisés répondant aux lignes directrices pour l'évaluation de formes topiques: tests d'étalement, tests de stabilité, rhéologie, observation de l'incorporation des nanoparticules au microscope électronique à balayage (MEB), évaluation *ex-vivo* de la diffusion cutanée par le dispositif VitroPharma® qui est une alternative à la cellule de Franz, évaluation *in-vivo* de la toxicité et de l'efficacité du traitement à l'aide d'un modèle souris de psoriasis induit par imiquimod.

De plus, une évaluation quantitative du relargage de la substance active à partir des nanoparticules est réalisée par dosage de l'absorbance en ultra-violet. L'ensemble des tests de caractérisation réalisés pendant cette étude nous a permis de sélectionner une formulation optimale répondant aux critères souhaités pour l'inhibition de la voie de signalisation JAK/STAT dans le traitement topique du psoriasis.

Le récepteur mGlu7 : une nouvelle cible dans le traitement des addictions ?

Z. Hajasova ¹, C. Canestrelli ¹, D. Rigault ², I. Brabet ³, C. Goudet ³, F. Acher ², F. Noble ¹, et N. Marie ¹

¹CNRS ERL 3649 “Neuroplasticité et thérapies des addictions”, Inserm UMR-S 1124, Université Paris Descartes; ²CNRS UMR 8601 “Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques”, Université Paris Descartes ; ³CNRS UMR 5203, Inserm U 1191, “Institut de Génomique Fonctionnelle”, Université de Montpellier

Contexte : La dépendance aux drogues, telles la cocaïne ou les opiacés (morphine et ses dérivés), est une maladie psychiatrique chronique et récidivante principalement caractérisée par une prise compulsive de substances psychoactives. C'est un problème majeur de santé publique puisqu'elle se traduit par une morbi-mortalité élevée. Alors qu'il n'existe pas de traitement spécifique pour la dépendance à la cocaïne, l'addiction aux opiacés a bénéficié des traitements de substitution. Néanmoins, leur utilisation n'empêche pas complètement la rechute qui reste le principal problème dans le traitement des addictions. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques sur lesquelles agir pour prévenir les rechutes. Les données précliniques obtenues ces dernières années montrent que le système glutamatergique est une cible prometteuse dans le traitement des addictions. Ainsi, il a été montré que la rechute s'accompagnait d'une augmentation de la libération de glutamate dans les structures cérébrales impliquées dans l'addiction, suggérant qu'inhiber cette libération pourrait bloquer la rechute. Un moyen pour inhiber cette libération de glutamate consiste à stimuler les récepteurs présynaptiques glutamatergiques tels que le mGlu7.

Objectif : Le but de ce travail est de montrer que les récepteurs mGlu7 pourraient être une cible intéressante dans le traitement de la dépendance aux opiacés et de cocaïne.

Méthodes : Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé le LSP2-9166 (un agoniste mixte des récepteurs mGlu4/mGlu7 et le plus puissant agoniste orthostérique mGlu7 synthétisé jusqu'à présent) dans deux modèles d'addiction chez les souris : la sensibilisation comportementale qui évalue la sensibilisation du système dopaminergique par mesure de l'activité locomotrice et la préférence de place conditionnée qui mesure l'appétence et les effets renforçant des drogues. Résultats : Alors que le LSP2-9166 n'a pas d'effets sur l'expression de la sensibilisation comportementale induite par un traitement chronique à la morphine, il bloque l'expression de la préférence de place conditionnée à la morphine et à la cocaïne. Ces effets ne sont pas dus à un effet du LSP2-9166 sur l'activité locomotrice ou l'état hédonique. De plus, aucun effet significatif sur l'état d'anxiété ou la dépression n'a pas été observé suite à l'injection de cet agoniste.

Conclusion et Perspectives : Ces résultats suggèrent que le récepteur mGlu7 pourrait être une cible pertinente dans le traitement des addictions et l'effet du LSP2-9166 dans la prévention de la rechute est en cours d'exploration. Toutefois, le rôle ce récepteur doit être confirmé en déterminant notamment le rôle respectif des récepteurs mGlu4 et mGlu7 dans les effets du LSP2-9166 grâce à l'utilisation d'antagonistes sélectifs de ces deux sous-types de récepteurs.

Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties

Alain C. Jung, Anne-Marie Ray, Ludivine Ramolu, Christine Macabre, Joseph Abecassis, Monique Dontenwill and Sophie Martin

Université de Strasbourg, LBP, CNRS UMR 7213, Illkirch, France, Laboratoire de Biologie Tumorale, EA 3430 Université de Strasbourg, CRLC Paul Strauss, Strasbourg, France

Introduction: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) constitute a heterogeneous group of malignancies with diverse prognosis depending on aetiology [alcohol/tobacco consumption vs. Human papillomavirus (HPV) infection], tumour localisation, tumour stage at diagnosis and involvement of metastatic lymph nodes (LNM). Since no molecular prognostic markers are available to date, only standard clinical (TNM) staging is used to guide therapeutic choice, which mainly relies on surgery, radiation therapy and chemotherapy, alone or in combination. Loco-regional relapse, LNM, second cancer and distant metastasis are responsible for treatment failure, which occurs in 40-60% of the patients, resulting in poor overall survival (40-50% at 5 years). Therapeutic options are limited for recurrent/metastatic HNSCC. The identification of predictive biomarkers of patient at risk for distant metastasis and therapies are urgently needed.

Material and method: Our study was conducted of a core set of 46 HNSCC with metastatic extension as the first recurrence event within a follow-up period of 36 months, and 52 tumours that did not evolve at all. A subgroup of patients called “R1” of poor prognosis was identified. “R1” is characterized by a high degree of molecular similarity at the level of the transcriptome, methylome and miRNome, and by the rapid occurrence of distant metastasis. Intriguingly, pathway enrichment analysis showed that these tumours have highly significant changes of factors involved in cell-cell communication and epithelial-mesenchymal transition (EMT). Levels of caveolin-1 (Cav1) expression with respect to overall survival and metastasis free progression were analyzed. In parallel, the consequences of Cav1 manipulation on migration, evasion, invasion and EMT was studied in HNSCC cell lines.

Results: Here, we showed that “R1” patients do not or at very low level express Cav1. Low or no expression of Cav1 is of bad prognosis. Disappearance of Cav1 enables cells to EMT. EMT is associated with enhanced migration, evasion and invasion. Our study uncovered a new target, $\alpha 5\beta 1$ integrin. Targeting $\alpha 5\beta 1$ integrins might not only prevent metastasis of HNSCC but also delay the development of the primary tumor by reducing tumor cell viability.

Conclusion: Cav1 detection might be taken into consideration in the future in the clinic not only to identify patients at high risk of metastasis but also to select patient who might benefit from an anti-integrin therapy.

New advances on the molecular organization of membrane-bound NEU1, the catalytic subunit of the elastin receptor complex

P. Maurice¹, S. Baud^{1,2}, C. Kawecki¹, O. Bocquet¹, O. V. Bocharova³, E. V. Bocharov³, A. S. Kuznetsov³, A. Heinz⁴, C. Schmelzer⁴, B. Romier-Crouzet¹, L. Gorisse¹, L. Duca¹, S. Blaise¹, L. Martiny¹, M. Dauchez^{1,2}, R. G. Efremov³, L. Debelle¹.

¹UMR CNRS 7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Equipe 2 "Vieillesse matricielle et remodelage vasculaire", Université de Reims Champagne Ardenne (URCA), UFR Sciences Exactes et Naturelles, Reims, France ; ²Plateau de Modélisation Moléculaire Multi-échelle (P3M), URCA, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Reims, France ; ³M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia ; ⁴Institut für Pharmazie, IB Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany.

Introduction : Elastin is one of the major extracellular matrix (ECM) component of the arterial wall providing the elastic recoil properties and resilience essential for vascular function. ECM remodeling during vascular aging is associated with elastin fragmentation and generation of bioactive elastin-derived peptides (EDP) that accumulate in the blood. EDP exert their biological effects through neuraminidase 1 (NEU1). This sialidase is associated to the plasma membrane and interacts with the elastin binding protein and the protective protein/cathepsin A, forming the elastin receptor complex (ERC). Results of our team from the last five years have brought significant insights on the critical role played by NEU1 in signal transduction and pathophysiological effects mediated by the ERC in vascular diseases, such as type 2 diabetes [1], atherosclerosis [2] and thrombosis [3]. Together, these results place NEU1 not only as a catabolic enzyme but also as a key actor involved in cell signaling regulation at the plasma membrane. However, its membrane organization is not understood.

Methods & Results: By combining computational and structural biology approaches with molecular and biochemical analyses, we show, for the first time, that membrane-bound human NEU1 can form homodimers. The 148-168 and 316-333 regions were identified as potential transmembrane (TM) helix and dimerization interfaces. The two corresponding recombinant ¹⁵N-labeled TM peptides were produced and analyzed by nuclear magnetic resonance and circular dichroism in different membrane-mimicking environments. Results show that both regions can form a stable α -helix suited for self-association. Importantly, introduction of single mutations within the 316-333 region by site-directed mutagenesis disrupts NEU1 dimerization and affects membrane sialidase activity.

Moreover, we have developed a proteomic approach to identify the protein complexes associated to this membrane-bound NEU1. A two-step purification strategy was first developed in COS-7 cells over-expressing NEU-1 then successfully applied to THP1-derived macrophages endogenously expressing NEU1. Preliminary results obtained by mass spectrometry revealed known interaction partners such as beta integrins but also new potential ones.

Conclusion : In conclusion, these results demonstrate, for the first time, that NEU1 contains two important regions that may anchor the sialidase in the membrane, control its dimerization and sialidase activity. At the plasma membrane, NEU1 interacts with a wide range of proteins that may contribute to the pathophysiological effects of EDP observed in vivo. Finally, these results also open new avenues on the ERC stoichiometry at the plasma membrane.

References : 1. Blaise S, Romier B, Kawecki C, Ghirardi M, Rabenoelina F, Baud S, Duca L, Maurice P, Heinz A, Schmelzer CE, Tarpin M, Martiny L, Garbar C, Dauchez M, Debelle L, Durlach V. Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice. *Diabetes*. 2013; 62(11):3807-16. 2. Gayral S, Garnotel R, Castaing-Berthou A, Blaise S, Fougerat A, Berge E, Montheil A, Malet N, Wymann MP, Maurice P, Debelle L, Martiny L, Martinez LO, Pshezhetsky AV, Duca L, Laffargue M. Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3K γ pathway. *Cardiovasc Res*. 2014; 102(1):118-27. 3. Kawecki C, Hézard N, Bocquet O, Poitevin G, Rabenoelina F, Kauskot A, Duca L, Blaise S, Romier B, Martiny L, Nguyen P, Debelle L, Maurice P. Elastin-derived peptides are new regulators of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(12):2570-8.

An intranasal formulation of erythropoietin (Neuro-EPO) prevents memory deficits and amyloid toxicity in the APPSwe transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Tangui Maurice¹, Yamila Rodríguez Cruz^{2,3}, Manon Strehaiano¹,
Teresita Rodríguez Obaya^{2,3}, Julio César García Rodríguez^{2,3}

¹*Inserm U1198, University of Montpellier, F-34095 Montpellier, France,* ²*Department of Histology, Institute of Preclinical and Basic Sciences, University of Medical Sciences, Havana, Cuba,* ³*Center for Molecular Immunology, Havana, Cuba*

Erythropoietin (EPO) is a cytokine known to have effective cytoprotective action in the brain, particularly in ischemic, traumatic, inflammatory and neurodegenerative conditions. We previously reported the neuroprotective effect of a low sialic form of EPO, Neuro-EPO, in rodent models of stroke or cerebellar ataxia and in a non-transgenic Alzheimer's disease (AD) mouse model (Maurice et al., *J. Psychopharmacol.* 2013; 27:1044-57). We here analyzed the protective effect of Neuro-EPO in APPSwe mice, a transgenic mouse model of AD. Mice were administered 3 times a day, 3 days in the week with Neuro-EPO (125, 250 µg/kg) intranasally, between 12 and 14 months of age. Motor responses, general activity and memory responses were analyzed during and after treatment. Oxidative stress, neuro-inflammation, trophic factor levels and a synaptic marker were analyzed in the hippocampus or cortex of the animals. The deficits in spontaneous alternation, place learning in the water-maze and novel object recognition observed in APPSwe mice were alleviated by the low dose of Neuro-EPO. The increases in lipid peroxidation or in GFAP and Iba-1 contents in APPSwe mice were significantly reduced after Neuro-EPO. Activation of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways were analyzed. The increases in Bax/Bcl-2 ratio, TNF α or Fas ligand levels observed in APPSwe mice were reduced by Neuro-EPO. Finally, the Elisa analyses of A β 1-42 levels in the APPSwe mouse cortex showed a -56% and -83% decrease in soluble and insoluble A β 1-42 forms, respectively. This study therefore confirmed the neuroprotective potential of EPO, particularly for an intranasally deliverable formulation devoid of erythropoietic side-effects, in a transgenic mouse model of AD. The cytokine alleviated memory alterations, oxidative stress, neuroinflammation, apoptosis induction and amyloid load in 14-month old APPSwe mice.

Peut-on dévier la différenciation des cellules cancéreuses vers les cellules non- prolifératives par l'induction de la différenciation des cellules souches de cancer

S. Shah¹, C. Pimpie¹, I. Al-Dybiat¹, M. Pocard¹, et M. Mirshahi¹

¹*Sorbonne Paris Cité, UMR Univ. Paris 7, INSERM U965 L'Hôpital Lariboisière, Paris France.*

But : pour éviter le traitement cytotoxique chez les malades atteints du cancer, dévier la différenciation des cellules souches de cancer peut être une autre alternative. Dans cet objectif, nous analysons la transition épithélio-mésenchymateuse (proliférative) ou la différenciation des cellules mésenchymales vers des cellules différenciées (non proliférative).

Méthodes : Plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines d'origines différentes, Cancer du sein (MCF-7), cancer de l'ovaire (OVCAR-3), cancer gastrique (Kato III) et aussi un cas d'une malade atteinte d'un cancer de l'ovaire ont été examinés. Les phénotypes de cellule souche de cancer ont été identifiés par RT-qPCR en utilisant plusieurs amorces (E-Cad, Slug, Snail, OCT3/4, Vimentine, Nanog, Nestin, Cxcr-4 and MDR 1-5) ou en utilisant des anticorps anti : CD44, CD73, CD90, CD105, CD117 et CD133 en cryométrie de flux. L'influence des milieux spécifiques pour la différenciation des cellules mésenchymateuses comme les milieux d'induction en adipocyte, chondrocyte, ostéocyte et cellule neuronale ont été étudiés en effectuant des tests de prolifération en temps réel (xCELLigence), expression génique et expression des marqueurs définis par FACS. L'identification des cellules différenciées a été réalisée en utilisant des colorants cellulaires ou par immunocytologie, red oil o (adipocyte), bleu Alcian (chondrocyte), Alizarin (Osteocyte) et anti neurofilament (cellules neuronale). La différenciation des cellules d'un nodule carcinomateux d'un cancer de l'ovaire en cellules neuronales a été mise en évidence par immunohistochimie à l'aide des anticorps comme l'anti énoïase neuronale, neuro filament, NCAM, chromogranine et la protéine S100. Les zones proliférative et non proliférative ont été distinguées grâce à la recherche des cellules en mitoses ou avec l'anticorps Ki67.

Résultats : tous les trois lignées MCF-7, OVCAR-3 et KATO III forment des sphères dans le milieu de culture spécifiques. Le taux d'ARNm pour différents marqueurs de cellules mésenchymales (E- Cad, Slug, Snail, OCT3/4, Vimentine, Nanog, Nestin, Cxcr-4 and MDR 1-5) varie selon les lignées, mais toutes ont une caractéristique mésenchymateuse. En cytométrie en flux, différents marqueurs mésenchymateux sont exprimés en fonction des cellules MCF-7 (CD44, CD90), OVCAR-3 (CD44, CD90, CD117, CD133) et le KATO III (CD44, CD90, CD133).

L'incubation des lignées cellulaires avec les milieux de différenciation en adipocytes, chondrocytes et cellules neuronales semblent diminuer significativement la prolifération des cellules cancéreuses en modifiant le phénotype mésenchymateuse des cellules. Au contraire, le milieu de différenciation en ostéocytes semble augmenter la prolifération de certaines lignées, notamment MCF-7.

En parallèle, nous avons examiné un cas de carcinose d'origine ovarienne avant et après le traitement par la chimiothérapie. L'analyse anatomopathologique a révélé que dans les nodules tumoraux après traitement, nous pouvons distinguer 2 zones, la zone proliférative (Ki67+) et la zone non proliférative (Ki67-). Curieusement, la zone non proliférative exprime des marqueurs neuronaux comme : énoïase neuronale, neuro filament, NCAM, chromogranine et la protéine S100. La présence de ces marqueurs dans la zone non proliférative suggère la tendance de différenciation des cellules du cancer de l'ovaire vers d'autre tissu comme le tissu neuronal.

Conclusion : Ces résultats indiquent que les cellules cancéreuses avec caractéristiques mésenchymateuses peuvent être déviées dans une condition de stress telle que la chimiothérapie, en des cellules différenciées. Dans cette transition ; les cellules prolifératives perdent leur activité mitotique et, en conséquence, toute voie impliquée dans la signalisation de cette transition peut être une cible pour le traitement du cancer.

Identification de modulateurs de LINGO-1 par BRET et intérêt pour le traitement des gliomes

L. Cobret¹, A. Guillemain¹, M-L. De-Tauzia¹, M. Decoville¹ et S. Morisset-Lopez¹

¹*Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR 4301, Université d'Orléans, 45071 Orléans Cedex, France*

Résumé : Les gliomes représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Elles sont d'une grande hétérogénéité, ce qui rend leur prise en charge difficile. Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années pour identifier les altérations moléculaires mises en jeu dans les gliomes. Parmi elles, une amplification/surexpression du proto-oncogène EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et des voies de signalisation qui lui sont associées ont été largement décrites. Cependant les essais cliniques utilisant des inhibiteurs de phosphorylation de l'EGFR ont été décevants. Ainsi, l'identification d'autres cibles pharmacologiques pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques. Notre projet est basé sur l'une de ces cibles, la protéine LINGO-1, qui interagit de façon fonctionnelle avec l'EGFR.

LINGO-1 appartient à la famille des protéines transmembranaires et possède 12 motifs LRR (Leucine-Rich Repeat), un domaine Ig (Immunoglobulin) et un domaine transmembranaire. LINGO-1 est spécifique du système nerveux et régule négativement la survie neuronale, la différenciation des oligodendrocytes et la myélinisation. Alors qu'il avait été décrit que LINGO-1 était capable d'interagir en trans sur deux cellules voisines pour réguler la myélinisation (Jepson et al., 2012), nous avons montré par la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) que LINGO-1 peut interagir en cis (sur une même cellule) pour former des dimères voir des oligomères. En effet, nous observons un signal BRET très intense (1800 mBu) et spécifique après co-expression de LINGO-1-Rluc et LINGO-1-YFP dans des cellules HEK-293. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette méthode pourrait nous permettre d'identifier de nouveaux ligands de LINGO-1 et/ou inhibiteurs de dimérisation en repérant des variations du signal BRET provoquées par ces ligands suite à des modifications conformationnelles au niveau des dimères. Afin de valider ce concept, nous avons réalisé un premier criblage à partir de la chimiothèque Prestwick contenant 1200 molécules. Nous avons ainsi identifié 5 molécules qui diminuent (de 25 à 50%) le signal BRET et quatre qui l'augmentent (15 à 20%). Nous avons concentré nos recherches sur l'une de ces molécules, la phenoxybenzamine hydrochloride (PHEN) qui provoquait un changement de signal BRET le plus intense (-50% de diminution du signal au BRET50). Sachant que ce test BRET n'est en aucun cas prédictif de l'activité (activateur/inhibiteur de LINGO-1) d'une molécule, nous avons donc mis au point un test d'activité de LINGO-1 sur cellules vivantes. Nous avons montré que la surexpression de LINGO-1 empêche la phosphorylation de ERK_{1/2} induite par l'EGF par analyse de Western Blot et en utilisant une nouvelle technologie basée sur l'Alpha Screen (Perkin Elmer). La PHEN agit comme un activateur de LINGO-1 et potentialise l'inhibition de la voie EGFR induite par LINGO-1 (Cobret et al, 2015). En accord avec ces résultats, cette molécule a également été identifiée comme un inhibiteur de la prolifération et de la migration des glioblastomes (Lin et al., 2015). Ces données nous laissent penser que LINGO-1 serait une cible particulièrement intéressante et encore largement inexploitée dans le traitement des gliomes.

L'analyse multiplexée de l'activité des canaux TRP à la lumière du BRET

Hermanus Ruigrok¹, Guillaume Shahid¹, Bertrand Goudeau², Florence de Gannes¹, Emmanuelle Haro¹, Annabelle Hurtier¹, Isabelle Lagroye¹, Pierre Vacher³, Neso Sojic², Stéphane Arbault², Bernard Veyret¹ and Yann Percherancier¹.

¹Laboratoire IMS / UMR 5218. Equipe de Bioélectromagnétisme. Université Bordeaux. ²Laboratoire ISM / UMR 5255. Groupe Nano-Système Analytique. E.N.S.C.B.P, Pessac. ³Laboratoire INSERM VINCO U916. Institut Bergonié. Bordeaux.

Résumé : Du fait de leur rôle dans de nombreuses et diverses pathologies, les canaux ioniques représentent la deuxième plus grande classe de cible pharmacologique après les récepteurs couplés aux protéines G. Toutefois le criblage de nouvelles molécules ciblant les canaux ioniques reste peu développé, principalement en raison de difficultés à mettre en oeuvre des techniques de criblage adaptées au haut-débit. Si l'avènement des systèmes électrophysiologiques automatisés a commencé à révolutionner la découverte de drogues ciblant les canaux ioniques, cette technique reste très onéreuse et demande un haut niveau de qualification pour sa mise en oeuvre.

Le transfert d'énergie en résonance de bioluminescence (BRET) est une technique biophysique qui permet, grâce à l'acquisition de signaux bioluminescents, de mesurer en temps réel et sur cellule vivante, la dynamique des interactions entre protéines, ainsi que les modifications structurales et/ou conformationnelles des protéines, qui sont le reflet de leur activation. Depuis le début des années 2000, l'apparition de biosenseurs basés sur le principe du BRET a permis une approche totalement nouvelle de la dynamique spatiotemporelle de la signalisation cellulaire. En outre la technique de BRET est extrêmement simple à mettre en oeuvre, très économique, et elle est acceptée et utilisée par le monde industriel. Étonnamment, et malgré ces avantages, aucune sonde basée sur le principe du BRET n'a encore été réalisée pour mesurer l'activité de canaux ioniques.

Nous avons donc construit et caractérisé diverses sondes BRET qui permettent de mesurer directement l'activité des canaux TRP (Transient Receptor Potential). Ces sondes BRET ont fait l'objet d'un brevet international avec l'appui de la SATT Aquitaine. En prenant comme modèle d'étude les canaux TRPV1, nous montrons que nos sondes BRET permettent d'analyser très simplement les différents modes d'activation de ces canaux (chimique, pH et température) et d'en étudier l'inhibition par des antagonistes connus. Les constantes pharmacologiques dérivées de nos expériences sont tout à fait conformes à ce qui a été publié précédemment avec d'autres méthodes. Nous montrons également que les sondes, mises au point sur TRPV1, peuvent être facilement dérivées afin d'étudier l'activité d'autres canaux TRP, tels que les canaux TRPV3 et TRPV4.

Finalement, nous avons développé une méthode spectrale d'acquisition et d'analyse des signaux de BRET qui permet la lecture multiplexée de trois signaux de BRET au sein d'un seul échantillon. À l'aide de sondes dirigées contre TRPV1, 3 et 4, nous montrerons comment, grâce à la lecture spectrale des signaux de BRET, il est possible de mesurer la dynamique de l'activation de ces trois canaux en temps réel et sur cellules vivantes. Ceci représente une avancée majeure qui permettra à terme d'étudier la cinétique de l'effet de chimiques sur plusieurs cibles pharmacologiques en simultané, et non pas sur un seul échantillon à la fois avec une mesure ponctuelle.

Nos résultats montrent combien le BRET spectral est une technique d'avenir pour le criblage de candidats médicaments dirigés contre les canaux ioniques, et qui ouvre de nombreuses perspectives pour d'autres cibles pharmacologiques d'intérêt.

A Fluorescent Oligothiophene-Bis-Triazine ligand interacts with PrP fibrils and detects SDS-resistant oligomers in human prion diseases.

Thibaut Imberdis¹, Adeline Ayrolles-Torro¹, Alysson Duarte Rodrigues², Gabor G. Kovacs³, Jean-Michel Verdier¹, Mike Robitzer³ & Véronique Perrier^{1‡}

¹Université Montpellier, Inserm, U1198, Montpellier cedex 5, France, ²Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS-UM-ENSCM-UMI, Montpellier cedex 5, France, ³Institute of Neurology, Medical University of Vienna, A-1097 Vienna, Austria.

Prion diseases are characterized by the accumulation in the central nervous system of an abnormally folded isoform of the prion protein, named PrP^{Sc}. Aggregation of PrP^{Sc} into oligomers and fibrils is critically involved in the pathogenesis of prion diseases. Oligomers are supposed to be the key neurotoxic agents in prion disease, so modulation of prion aggregation pathways with small molecules can be a valuable strategy for studying prion pathogenicity and for developing new diagnostic and therapeutic approaches. We previously identified thienyl pyrimidine compounds that induce SDS-resistant PrP^{Sc} (rSDS-PrP^{Sc}) oligomers in prion-infected samples. Due to the low effective doses of the thienyl pyrimidine hits, we synthesized a quaterthiophene-bis-triazine compound, called MR100 to better evaluate their diagnostic and therapeutic potentials. This molecule exhibits a powerful activity inducing rSDS-PrP^{Sc} oligomers at nanomolar concentrations in prion-infected cells (1). Fluorescence interaction studies of MR100 with mouse PrP fibrils showed substantial modification of the spectrum, and the interaction was confirmed *in vitro* by production of rSDS-oligomer species upon incubation of MR100 with fibrils in SDS-PAGE gel. We further explored whether MR100 compound has a potential to be used in the diagnosis of prion diseases. Our results showed that: (i) MR100 can detect rSDS-oligomers in prion-infected brain homogenates of various species, including human samples from CJD patients; (ii) A protocol, called “Rapid Centrifugation Assay” (RCA), was developed based on MR100 property of inducing rSDS-PrP^{Sc} oligomers only in prion-infected samples, and avoiding the protease digestion step. RCA allows the detection of both PK-sensitive and PK-resistant PrP^{Sc} species in rodents samples but also from patients with different CJD forms (sporadic and new variant); (iii) A correlation could be established between the amount of rSDS-PrP^{Sc} oligomers revealed by MR100 and the duration of the symptomatic phase of the disease in CJD patients; and (iv) Bioassay experiments showed that MR100 can trap prion infectivity more efficiently than P30 drug. MR100 is a powerful tool not only for studying the prion aggregation pathways regarding oligomeric and sPrP^{Sc} species, but also for developing alternative methods for the detection of prion-infected samples and prion decontamination approaches.

(1) Imberdis T., et al. (2016) A fluorescent oligothiophene-Bis-Triazine ligand interacts with PrP fibrils and detects SDS-resistant oligomers in human prion diseases. *Molecular Neurodegeneration* 11:11.

Non classical ligand-independent regulation of G protein by the orphan GPCR GPR158

Mariana Hajj¹, Teresa De Vita¹, Claire Vol¹, Charlotte Renassia¹, Jean-Charles Bologna¹, Isabelle Brabet¹, Magali Cazade¹, Jaroslav Blahos², Gilles Labesse³, Jean-Philippe Pin¹, Laurent Prézeau¹

¹ CNRS UMR 5203, INSERM U661 and Université Montpellier 1 & 2, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier Cedex 5 F-34094, France. ² Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic and Department of Pharmacology, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic. ³ CNRS UMR 5048, INSERM UMR 1054 and Université Montpellier 1 & 2, Centre de Biologie Structurale, Montpellier Cedex 5 F-34094, France.

The orphan G protein-coupled receptors (GPCR) GPR158, expressed mainly in the brain and in the retina, could contribute to diseases like glaucoma and cancers. GPR158 is associated to RGS7- β 5 complex and α subunit of G protein. However, it is still unknown whether GPR158 behaves as a classical GPCR and couples to G proteins, and if this involves interaction with its partners. To address this point, we expressed GPR158 in HEK293 cells and analyzed its functional behavior. First, we observed that GPR158 bound RGS7- β 5 complex in a 50 residues region downstream of its transmembrane domain, and that this interaction stabilized RSG7 expression. Second, we demonstrated that VCPWE motifs in the last third of GPR158 C-term domain were involved in α binding. Third, we asked whether GPR158 could display classical coupling toward Gq, Gs or Gi/o proteins. When using a BRET approach to assess Go activity, we observed that increasing expression level of GPR158 augmented the number of active Go, suggesting a possible constitutive coupling activity. However, neither natural nor mutation-induced constitutive activity of GPR158 could be measured in various functional assays. Finally, we demonstrated that this effect did not result from a constitutive coupling of GPR158, but rather from the trapping of active α by its VCPWE motifs. Thus, our data question the ability of GPR158 to couple to G proteins, and brought evidence that GPR58 behaves as an AGS (Activation of G protein Signaling) factor. GPR158 will locally regulate G protein signaling, via its VCPWE motifs that stabilize and trap active α , and its partner RGS7 that deactivates α .

Early neurovascular changes precede long-lasting behavioral deficits after juvenile traumatic brain injury

B. Rodriguez-Grande¹, A. Ichkova¹, T. Bessy¹, S. Bertrand¹, J. Badaut¹

¹*CNRS-INCIA-Université de Bordeaux, Bordeaux, France*

Introduction: Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of death and disability amongst children and adolescents. Moreover, mild/moderate TBI (mTBI) is frequently under-diagnosed, with patients being soon discharged from the hospital. However, growing evidence shows that behavioral impairments endure or even arise months after injury, without a full knowledge of their pathophysiology. We aimed to characterize these deficits and identify the cellular mechanisms underlying juvenile mTBI (jmTBI).

Materials and Methods: We developed a new model of closed-head jmTBI on postnatal day 17 mice using an electro-magnetic impactor on non-fixed head, allowing rotation, with 2 severity grades with no skull fracture: mild (1 mm impact depth, 2 m/s speed) and moderate (3 mm impact depth, 3 m/s speed). Mice were evaluated with a battery of behavioral tests followed by morpho-functional neurovascular unit assessment.

Results: Increasing severity caused a significant increase in the time to resume exploratory behavior after impact. Over 60% of mice from the moderate group and none in the mild group exhibited subdural/intraparenchymal hemorrhages 24 h after injury. Impairment in vascular reactivity (*ex vivo* contraction of cortical vessels in response to thromboxane agonist applied to acute brain slices) was observed in the moderate group 24 h post-jmTBI. Both grades of jmTBI induced significant blood-brain barrier dysfunction (assessed by IgG infiltration) and significant astrogliosis (assessed by GFAP staining) in the ipsilateral hemisphere 3 days after injury. IgG infiltration and astrogliosis were also observed in the contralateral corpus callosum, suggesting that fibers were especially sensitive to rotation. As in clinical mild TBI, there was no major neurological deficit at 1 and 3 days post-jmTBI. However, our longitudinal analysis up to 1 month post-jmTBI showed significant anxiety (open field test) and a trend for cognitive decline (novel object location test) in the moderate group 1 month post-jmTBI.

Conclusion: In summary, early significant vascular and astrocytic changes may contribute to longterm behavioral impairments. Our results strongly suggest that the neurovascular unit represents a promising target for pediatric mTBI patients.

Thématique

« Les biomédicaments et thérapies innovantes »

Utilisation de nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les glioblastomes et augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

C. Anfray^{1, 2, 3, 4}, A. Chakhoyan^{1, 2, 3, 4}, S. Komaty-Zaarour^{2, 5}, E. Petit^{1, 2, 3, 4}, L. Chazalviel^{1, 2, 3, 4}, J. Toutain^{1, 2, 3, 4}, D. Divoux^{1, 2, 3, 4}, C. Allieux^{1, 2, 3, 4}, E.T. MacKenzie^{1, 2, 3, 4}, M. Bernaudin^{1, 2, 3, 4}, O. Touzani^{1, 2, 3, 4}, K. Bordji^{1, 2, 3, 4}, S. Mintova^{2, 5} et S. Valable^{1, 2, 3, 4}

¹CNRS, UMR 6301 ISTCT, équipe CERVOxy. GIP CYCERON, Bd Henri Becquerel, BP5229, F-14074 CAEN cedex, France. ²Université de Caen Basse-Normandie. ³CEA, DSV/I2BM. ⁴Normandie Univ. ⁵Laboratoire Catalyse et Spectrochimie (LCS), CNRS, ENSICAEN, 6 boulevard du Maréchal Juin, 14050 Caen, France.

Introduction: L'hypoxie est l'une des principales causes de résistance des glioblastomes (GB) face à la radiothérapie. Ainsi, il était attendu que l'inspiration de carbogène (95% d' O₂ et 5% de CO₂) par le patient puisse réduire l'hypoxie tumorale et ainsi augmenter l'efficacité de la radiothérapie, mais les résultats des essais cliniques ont été négatifs. Cette étude a pour but d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'échec de cette stratégie et de proposer une stratégie alternative d'oxygénation des tumeurs. Dans cet objectif, nous avons dans un premier temps évalué la capacité du carbogène à augmenter la quantité de sang et l'oxygénation dans la tumeur et identifié les mécanismes limitant cette réoxygénation. Dans un second temps nous avons proposé une stratégie alternative visant à augmenter l'oxygénation intra-tumorale par l'utilisation de nanocristaux de zéolites, des nanoparticules poreuses capables de vectoriser des thérapies gazeuses.

Méthodes: Deux modèles orthotopiques de GB humains (U87-MG et U251-MG) ont été utilisés chez des rats athymiques. Deux paramètres ont été analysés par IRM (7T) : le fCBV (Fractional Cerebral Blood Volume) et la S_{MRI}O₂ (saturation sanguine). Les mesures ont été effectuées sous ventilation en air (ligne de base) ou en carbogène. Ces paramètres ont été utilisés pour calculer les variations induites par le carbogène (exprimées en Δ fCBV & Δ S_{MRI}O₂). La capacité des nanovecteurs à atteindre la tumeur a été évaluée par imagerie T₂*w chez des rats porteurs de tumeurs auxquels avaient été injectés par voie intraveineuse des nanovecteurs modifiés par ajout d'atomes de fer dans leur structure.

En parallèle, la toxicité des nanocristaux de zéolites a été évaluée in vitro sur les cellules tumorales et les cellules environnantes du tissu cérébral. Dans ce but, une lignée cellulaire humaine (U87-MG) ainsi que des cultures primaires d'astrocytes et de neurones murins ont été mises en présence de concentrations croissantes de nanovecteurs pendant 24 et 48h, puis la toxicité a été évaluée par test de prolifération (WST-1), analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux et immunocytochimie γ H2AX.

Résultats: De façon attendue, l'hypercapnie entraîne une augmentation du fCBV et de la S_{MRI}O₂ dans l'hémisphère controlatéral (21,7±10,2% et 15±9,5% respectivement). Cependant, dans la tumeur, l'augmentation du fCBV est de 7,9±4,8% dans le modèle U87-MG, et seulement de 2,6±3,2% dans le modèle U251-MG. En parallèle, l'hypercapnie induit une augmentation de la S_{MRI}O₂ de 8,7±5,3% dans le modèle U87-MG et de seulement 4,5±5,2% dans le modèle U251-MG. Sur ces modèles, nous avons montré que ces zéolites injectés par voie systémique ont la capacité de s'accumuler dans le tissu tumoral au cours du temps.

Par ailleurs, jusqu'à une concentration de 100 μ g/ml, les résultats obtenus in vitro n'ont pas mis en évidence de cytotoxicité ni de génotoxicité des nanovecteurs sur les types cellulaires testés.

Conclusions: L'administration de carbogène par ventilation augmente le volume sanguin cérébral et la saturation en oxygène du tissu sain mais de manière très limitée au sein des tumeurs les plus hypoxiques et les moins vascularisées. Nous proposons donc une stratégie de réoxygénation tumorale alternative basée sur des nanovecteurs de thérapies gazeuses qui présentent la capacité de s'accumuler dans le tissu tumoral. La prochaine étape consistera en l'utilisation de nanovecteurs chargés en O₂ pour évaluer leur capacité à augmenter l'oxygénation du tissu tumoral.

Spadin and mini-spadin, a new efficient way in the treatment of depression

Marc Borsotto¹, Alaeddine Djilani¹, Christelle Devader¹, Jean Mazella¹, Catherine Heurteaux¹.

¹CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Université de Nice Sophia Antipolis, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

Introduction: We previously discovered spadin as a new antidepressant drug concept. Spadin exerts its antidepressant actions on the TREK-1 potassium channel, a new antidepressant (AD) target. We have shown that spadin acts more rapidly in comparison to other ADs. We have pointed out that spadin induces neurogenesis after only 4-day treatments. We have demonstrated that spadin does not display side effects at the cardiac level and on TREK-1 controlled functions such as stroke, epilepsy or pain.

Objectives: With the final goal to make spadin a drug for human clinic, our objective was to find analogs of spadin demonstrating a better affinity or a better *in vivo* stability or both.

Methods: Several analogs of spadin were synthesized. Their ability to block the TREK-1 channel activity were first tested by electrophysiology on HEK293 cells stably transfected with TREK-1 channels. AD effects were measured by using the forced swim test and the novelty suppressed feeding test. Neurogenesis was investigated by measuring the expression level of the synaptic protein PSD-95 in *in vitro* cultured neurons.

Results: Our data allow to identify a shortened spadin, called mini-spadin, that displayed the same AD properties as spadin and a 400 fold increase in the TREK-1 affinity. Mini-spadin increased the synaptogenesis marker PSD95 levels after only 24 hours of treatment, suggesting that like spadin, mini-spadin was able to induce neurogenesis and synaptogenesis.

Conclusions: Even if further experiments are required, the mini-spadin appears to be more efficient than spadin offering a very promising alternate to spadin as human drug.

Améliorer un traitement anti-hémophilique : études structurales et fonctionnelles

A. Thomas², A. Ersayin¹, R. Marlu¹, M. Castellan¹, A. Fontayne⁴, T. Abache⁴, J-L. Plantier⁴, N. Thielens³, B. Polack¹, et M-C. Dagher¹

¹Laboratoire TIMC-IMAG, UMR 5525 CNRS/UGA ; ²Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR5063 CNRS/UGA ; ³Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS/CEA/UGA ; ⁴LFB SA, Lille

Introduction : L'hémophilie est un désordre hémorragique dû au déficit en facteur de coagulation FVIII (hémophilie A) ou IX (hémophilie B). Les patients sont essentiellement traités par le remplacement intra-veineux des facteurs absents ou dysfonctionnels par des protéines purifiées à partir du plasma ou recombinantes. Ces thérapies induisent souvent la génération d'anticorps acquis. De ce fait, de nouvelles approches sont nécessaires. Les stratégies anti-hémophiliques les plus récentes ciblent le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), qui est l'inhibiteur majeur de la cascade de coagulation, et plus particulièrement du complexe Tenase extrinsèque.

L'équipe a proposé un Facteur Xa tronqué de son domaine de liaison à la membrane, le Gla-domainless Facteur Xa (GD-FXa) comme leurre moléculaire pour piéger le TFPI (1-2). Le TFPI existe sous deux isoformes différents, qui comprennent des domaines inhibiteurs de protéase de type Kunitz espacés par des boucles flexibles. Le domaine Kunitz 2 (K2) est connu pour se lier au domaine catalytique du FXa. L'objectif de ce travail est de proposer des mutants du GD-FXa avec une activité augmentée et de valider sur le plan fonctionnel ces mutants potentiels.

Méthodes : Le complexe moléculaire entre TFPI-K2 et le domaine catalytique du FXa a été modélisé et soumis à une dynamique moléculaire. La contribution résiduelle de l'interface en termes d'énergies d'interaction sur une trajectoire de 10ns a été analysée et a permis d'identifier des zones d'interaction diminuée. Des mutants susceptibles de se lier plus fortement avec le TFPI-K2 ont été conçus et soumis à la dynamique moléculaire. Les mutants ayant une énergie d'interaction plus forte ont été conçus. En parallèle, un système d'expression de GD-FXa recombinant à partir de cellules HEK en culture a été mis au point. Le processing correct du GD-FXa produit qui doit être coupé entre les deux chaînes a été analysé par Western blot. Les mutants ont été produits et exprimés, partiellement purifiés et leur activité a été analysée par des courbes dose-effet d'activité du GD-FXa (constantes d'inhibition K_i^* caractéristiques du « slow-tight binding » inhibiteur qu'est le TFPI). Les constantes d'affinité vont être caractérisées par SPR. L'effet anti-hémophilique va être testé in vitro grâce à un test de génération de thrombine sur un plasma déplété en Facteur VIIIa.

Résultats : La dynamique moléculaire a identifié deux acides aminés dont la mutation était susceptible d'améliorer la liaison du GD-FXa au TFPI. Un système d'expression du GD-FXa, avec processing correct du domaine catalytique, nécessaire pour le bon fonctionnement de l'enzyme, a été mis au point en système cellulaire HEK (3). La production et la purification de protéine ont été optimisées. Les mutants ont montré une capacité augmentée à restaurer la génération de thrombine sur les plasmas d'hémophiles. Les autres tests sont en cours et seront présentés.

Conclusions : la conception rationnelle de GD-FXa ayant une interaction augmentée avec sa cible a été développée. Les mutants proposés restaurent mieux l'activité d'un plasma d'hémophile que la protéine native. L'hypothèse d'une meilleure liaison au TFPI est en cours de validation fonctionnelle.

Références : (1) Marlu, R., and Polack, B. (2012) *Gla-domainless factor Xa: molecular bait to bypass a blocked tenase complex*, Haematologica 97, 1165-1172. ; (2) Thomas, A., and Polack, B. (2013) *A new procoagulant molecular decoy for treatment of hemophilia A or B with or without inhibitor*, Patent n° FR1151637. ; (3) Thomas, A., Dagher, M.-C., Marlu, R., and Polack, B. (2014) *Gla-domainless factor X*, Patent PCT/FR2014/051542.

Bispecific antibodies in breast cancer immunotherapy, the path forward?

DEL BANO Joanie^{1,2,3,4,5}, CHAMES Patrick^{1,2,3,4}, BATY Daniel^{1,2,3,4} and KERFELEC Brigitte^{1,2,3,4}

¹Inserm U1068, ²CNRS UMR7258, ³AMU U105, ⁴IPC, ⁵AP-HM.

Over the past 15 years, mounting evidence of the key contribution of NK cells in immunity against cancer has boosted the investigations into NK cell-based therapies. Among these strategies, monoclonal antibody-based therapeutics are currently the fastest growing segment of the drug and biological market. However, tumor-targeting antibodies often have to face up an exhausted environment induced by both cancer cells and infiltrated immune cells that is responsible for their suboptimal effectiveness.

Our objective is to manipulate NK cell functions and tumor targets using an original format of nanobody-based bispecific antibodies (bsFab) to revert the dampened immune response for treating breast cancer. Indeed, treatment and outcomes of HER2-amplified/overexpressing breast cancers have been revolutionized by the approval of the first HER2-targeting antibody, trastuzumab. However, a significant proportion of HER2 positive breast cancer are or become resistant to trastuzumab due to de novo or acquired resistances. As well, triple negative breast cancers are intrinsically insensitive to most of the current targeted therapies such as hormone therapy or trastuzumab. All these cancers are of poor prognosis and remain a clinical challenge despite the current therapeutic innovations.

We generate compact, linker-free bispecific formats that display a unique, specific and high affinity for FcγRIII on NK cells and a moderate affinity for two tumor associated antigens: the first one recognizes an HER2 epitope distinct from that targeted by trastuzumab (HER2xFcγRIII bsFab), the second one targets mesothelin (MesoxFcγRIII bsFab), a membrane protein involved in tumor invasion and metastasis and overexpressed in a large proportion of triple negative breast cancers. We demonstrated that, *in vitro*, HER2xFcγRIII induced NK-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against HER2^{high} and trastuzumab-refractive cell lines. Interestingly, both bsFabs triggered a remarkable NK mediated antitumoral activity against triple negative breast cancer cell lines. Combination of antibodies evidenced a synergistic anti-tumor activity of HER2xFcγRIII with trastuzumab on triple negative breast cancer cells.

Finally, in preclinical xenograft models, HER2xFcγRIII exhibited a net superiority over trastuzumab at inhibiting HER2^{low} tumor growth. Taken together, these data underline the potential of these bsFabs to enlarge the number of patients eligible for breast cancer immunotherapy and prompt to consider therapeutic combination strategies.

Assessing the effects of electroporation on tissues by in vivo optical imaging.

E Bellard; N Joncker; B Markelc; S Chabot; S Pelofy; MP Rols; J Teissie; M Golzio

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale du CNRS UMR 5089, 205 route de Narbonne 31077 TOULOUSE Cedex, France

Optical imaging is a powerful tool for laboratory animal studies in drug delivery. Different modalities of in vivo optical imaging exist: luminescence, fluorescence macroscopy, intravital microscopies combined or not with multiphoton excitation. Optical imaging allows detection with a high spatiotemporal resolution (not only in vitro but also in vivo) of specific signals such as molecular processes or cell-cell interactions. Electroporation/electroporation (EP) is one of the non-viral methods of vectorization based on the native transmembrane electric potential modulation of the cell by applying electric pulses. Permeabilization can be adjusted by the different electric parameters (intensity, number of pulses and duration) (1). This physical method thus enables the delivery of chemotherapeutic drugs into tumor cells in electrochemotherapy (ECT) (2) or nucleic acids for gene therapy purposes in gene electrotherapy (GET) (3) in healthy or cancerous tissues. We have investigated by in vivo fluorescence macroscopy, the kinetic and the efficiency of electrically-mediated delivery of nucleic acids (DNA, Minicircle, shRNA and siRNA) into different tissues (4). EP also has blood flow modifying effects, resulting in decreased blood flow and increased permeability of blood vessel walls. We visualized by intravital microscopy the effects of electric pulses used for ECT on blood vessels (5) and on endothelial cells (unpublished data). Finally, we have used different transgenic mice that express fluorescent reporter genes to analyze the dynamic of immune cells upon treatments (unpublished data). In the field of electroporation-based treatments, imaging techniques are powerful tools to observe the bio-distribution of molecules, to describe the mechanisms of their electro-delivery and to quantify their biological effects at the level of the organs or tissues as well as the level of the cell in living animal.

References

- [1] Mechanisms of Cell membrane Electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. Teissie J, Golzio M, Rols MP. *BBA 1724-General Subjects*. 2005: 270-280.
- [2] Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases. Tamzali Y, Borde L, Rols MP, Golzio M, Lyazrhi F, Teissie J. *Equine Vet J*. 2011: 2042-3306.
- [3] Nucleic Acids Electro-transfer: From Bench to Bedside. Chabot S, Rosazza C, Golzio M, Zumbush A, Teissie J, Rols MP. *Curr Drug Metab*. 2013: 300-8. Review.
- [4] Targeted electro-delivery of oligonucleotides for RNA interference: siRNA and anti-miR. Chabot S, Teissie J, Golzio M. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015:161-8. Review.
- [5] Bellard E, Markelc B, et al. Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electroporation. *J Control Release*. 2012 Sep 24;163 (3):396-403.

Ciblage pharmacologique de l'interaction TSP-1/CD47 par approche peptidique : de la modélisation moléculaire à la validation préclinique en oncologie

A. Jeanne^{1,2}, J. Devy¹, N. Floquet^{1,3}, N. Belloy^{1,4}, G.D. Sockalingum¹, P. Maurice¹, M. Dauchez^{1,4}, C. Schneider¹, L. Martiny¹ et S. Dedieu¹

¹UMR CNRS 7369 MEDyC, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, Reims, ²SATT Nord, Lille, ³BMM, UMR CNRS 5247, Montpellier, ⁴Plateforme de Modélisation Moléculaire Multi-échelle (P3M), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims

Introduction : La thrombospondine-1 (TSP-1) est une glycoprotéine matricielle multimodulaire surexprimée au niveau du stroma tumoral dans de nombreux types de cancers. Bien que sa contribution dans les processus de progression tumorale soit relativement complexe de par les fonctions pléiotropiques qu'elle exerce, la TSP-1 est largement reconnue comme un acteur clé au sein du microenvironnement tumoral et représente par conséquent une cible d'intérêt en thérapie anti-cancéreuse.

Méthodes : Une approche originale de **modélisation moléculaire** nous a permis d'appréhender précisément la dynamique de l'interaction qui s'établit entre la TSP-1 et le récepteur de surface cellulaire CD47, médiateur principal des propriétés pro-tumorales de la TSP-1. Dès lors, nous avons identifié un certain nombre de **peptides** parmi lesquels un dodécapeptide cyclique et soluble, nommé TAX2, qui se comporte comme antagoniste orthostérique de l'interaction TSP-1/CD47. En ciblant spécifiquement la TSP-1 au niveau du site de liaison avec CD47, le peptide TAX2 promeut une réponse anti-angiogénique en augmentant la biodisponibilité de la TSP-1 pour le récepteur CD36.

Résultats : Afin d'évaluer au mieux le potentiel thérapeutique du peptide TAX2 dans un contexte tumoral *in vivo*, une approche d'**imagerie multimodale** a été privilégiée afin de réaliser un suivi longitudinal et quantitatif de l'angiographie tumorale par micro-tomographie à rayons X, associé à l'analyse des tumeurs par IRM et micro-imagerie spectrale IRTF. Dans des modèles syngéniques de mélanome, le traitement de souris immunocompétentes par le peptide TAX2 perturbe considérablement la vascularisation des allogreffes sous-cutanées tout en inhibant fortement les processus de dissémination et de croissance métastatiques. Le transfert xénogénique de cellules de mélanome humain A375 chez la souris *nude* a permis de confirmer que les tumeurs traitées par le peptide TAX2 sont moins invasives et présentent une diminution du nombre de vaisseaux sanguins infiltrant la tumeur mais également du flux sanguin intra-tumoral, de manière comparable aux résultats obtenus avec le Bevacizumab utilisé comme contrôle positif. Dans le but d'étendre la preuve de concept de l'efficacité anti-tumorale du peptide TAX2, l'analyse intégrative de multiples banques de données génomiques et de *tissue microarrays* nous a permis d'identifier plusieurs types de tumeurs humaines surexprimant les cibles moléculaires du peptide TAX2. Dès lors, nous avons décidé d'évaluer les effets de cet **agent thérapeutique innovant** dans des modèles de xéngreffe de carcinome pancréatique (MIA PaCa- 2), de neuroblastome (SK-N-BE[2] et SK-N-SH) et de carcinome ovarien (A2780 et SK-OV-3). Dans l'ensemble de ces modèles, des administrations systémiques de faibles doses du peptide TAX2 (de l'ordre de 10 mg/kg/jour) diminuent la croissance tumorale d'au moins 50% tout en augmentant significativement la survie.

Discussion : L'évaluation des paramètres d'absorption-distribution-métabolisme-excrétion du peptide TAX2 ainsi que la réalisation d'**analyses pharmacocinétiques** chez le rat Sprague-Dawley ont révélé un profil de stabilité favorable ainsi qu'une absence d'inhibition enzymatique ou de toxicité cardiaque associées au traitement par le peptide TAX2. De même, aucun signe de toxicité *in vivo* n'a pu être observé jusqu'à la dose de 400 mg/kg en considérant de nombreux paramètres cliniques, biochimiques, hématologiques et histopathologiques. Enfin, l'administration du peptide TAX2 aux doses biologiquement actives n'altère ni les paramètres de coagulation, ni les numérations plaquettaires ou le temps de saignement.

Conclusions : Pour conclure, nous avons identifié par le biais d'**approches multimodales et transversales** un agent thérapeutique innovant, ciblant spécifiquement l'interaction TSP-1/CD47. De par son apparente absence de toxicité et son efficacité préclinique avérée, le peptide TAX2 se présente comme une **alternative thérapeutique innovante** en oncologie.

RGTA-4131®, an analogue of heparan sulfate, is a potential novel protective and regenerative therapy for ischemic stroke.

Yacine KHELIF^{1,2,3,4}, Marie-Sophie QUITTET^{1,2,3,4}, Jérôme TOUTAIN^{1,2,3,4},
Didier DIVOUX^{1,2,3,4}, Fernando SINERIZ⁵, Marie GILBERT⁵,
Denis BARRITAUT⁵, Omar TOUZANI^{1,2,3,4*}, Myriam BERNAUDIN^{1,2,3,4*}

¹CNRS, UMR6301-ISTCT, CERVOxy group. GIP CYCERON, Bd Henri Becquerel, BP5229, F-14074 CAEN cedex, France, ²Université de Caen Basse-Normandie, UMR6301-ISTCT, F-14074 CAEN cedex, France, ³CEA, DSV/I2BM, UMR6301-ISTCT, F-14074 CAEN cedex, France, ⁴Normandie Université, ⁵Société OTR3, 4 rue Française, 75001 PARIS, France, *Authors contributed equally to the work

Introduction: Stroke is one of the major causes of acquired disability in industrialized countries. Despite high prevalence and devastating outcome, the only treatment of ischemic stroke is thrombolysis with rt-PA which is applied only in a minority of patients (Adeoye et al., 2011) because of its narrow therapeutic window. In the present study, we evaluate a novel ischemic stroke therapy based on an innovative regenerating agent: the RGTA-4131® (ReGeneraTing Agent, OTR3). RGTA-4131® is a biodegradable nanopolymer mimicking the heparan-sulfate, a major component of the extracellular matrix (ECM). Since the ECM is altered during ischemic stroke (Morancho et al., 2010) and the RGTA-4131® was shown to repair ECM (Barritault et al., 2010), we hypothesized that RGTA-4131® may be a novel innovative therapy for stroke by restoring the ECM microenvironment and tissue homeostasis.

Material and Methods: To evaluate the potential of RGTA-4131® as a neuroprotective and/or regenerative therapy after an ischemic stroke, we used the model of transient (1 h) middle cerebral artery occlusion (MCAo) in 12 week-aged male Sprague-Dawley rats. We assessed brain damage with magnetic resonance imaging (MRI 7T) at the acute (48 h after ischemia) and the chronic (15d after ischemia) stages of the pathology. Moreover, we also assessed the functional deficits with seven behavioral tests during 54 days following the induction of ischemia. To investigate the therapeutical time window of RGTA-4131®, the agent was administered intravenously 1 h (n=15), 2.5 h (n=10), or 6 h (n=6) after the induction of ischemia. To define the optimal dose of RGTA-4131®, we analyzed the effects of three doses, namely, 0.5 mg/kg (n=10), 1.5 mg/kg (n=10), or 5 mg/kg (n=7).

Results: The administration of RGTA-4131®, 1 h following the induction of ischemia, at the dose of 1.5 mg/kg (i.v.) resulted in a robust and persisting reduction of brain damage (- 33% of infarct volume at 2 d and -23% of infarct volume at 15 d). Interestingly, this therapeutic intervention also improved functional recovery as attested by performances in behavioral tests. In the present model, initiation of the treatment at 2.5 h or 6 h after the occlusion resulted in minor or insignificant benefits on brain damage and neurological deficits, respectively. The evaluation of the dose effect of RGTA-4131® revealed that 0.5 mg/kg conferred the best as well as the more persistent neuroprotection. Nonetheless, both doses of 0.5 mg/kg and 1.5 mg/kg improved sensorimotor recovery in multiple behavior tests (including neurological score, adhesive test, and open field test).

Conclusion: This study demonstrates for the first time, in a pertinent model of stroke in the rat, the potential of RGTA-4131® to reduce brain damage and to improve sensorimotor deficits, with a reasonable therapeutic window. Overall, the data underline that the repair of the ECM is therefore an attracting target to reduce brain damage and to improve functional recovery following stroke.

Neutron reflectometry studies of recombinant OprF from *Pseudomonas aeruginosa* stably incorporated in supported lipid bilayers

M. Maccarini¹, L. Gayet¹, J-P Alcaraz¹, L. Liguori², E. B. Watkins³, J-L Lenormand¹, D. K. Martin¹

¹Laboratoire TIMC-IMAG, Université Grenoble Alpes, France; ²Institut de Biologie Structural, Grenoble, France; ³Los Alamos National Laboratory Los Alamos, New Mexico 87545, USA

Introduction: Infection by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is a serious problem for patients who are hospitalized with cancer, cystic fibrosis and burns [1]. The case fatality rate in these patients is near 50%. *P. aeruginosa* is primarily a nosocomial pathogen and the fourth most commonly-isolated nosocomial pathogen accounting for 10% of all hospital-acquired infections. Strains of the *P. Aeruginosa* bacterium are resistant to most of the common antibiotics used in hospitals, due mainly to the low permeability of its outer membrane [2]. OprF, the main porin of the *P. Aeruginosa* outer membrane, is responsible for this low permeability and it is thought to have an important role in the antibiotic resistance of the bacterium. For this reason, it is a very novel target for new drugs that will kill bacteria resistant to standard antibiotics. In our laboratories a novel cell-free method to synthesis the protein has been developed to provide controlled studies of the structure and function of OprF [3].

Results: By means of advanced biochemical techniques, we are able to incorporate it in a model lipid bilayer membrane (tLBM) that is tethered to gold electrodes. This tLBM system has allowed us to measure the conductance of OprF using impedance spectroscopy (EIS). OprF purified using the biochemical purification techniques and incorporated into proteoliposomes retained biological functionality as confirmed by binding to INF- γ . The crystallographic high-resolution structure of OprF is not available due to the difficulties involved in crystallising membrane proteins. By the use of neutron reflectometry (NR), we provided an alternative route to obtain fundamental low-resolution information on the nanoscale structure OprF, in an environment that mimics its native condition. NR allowed us to characterize the nanostructural details of the lipid membrane, the amount of the protein embedded in the bilayer, the thickness of the extramembrane domain of the proteins, which extends from the membrane. These investigations are not possible using the classical techniques of biology and reinforce the crucial role played by neutron scattering in evincing fundamental details of biological samples.

Conclusion: This study showed that OprF purified using the cell free protocol and then incorporated into tethered lipid bilayer yields a controllable (and measurable at the nanoscale) biomimetic system constructed *in vitro*. This system provides the means to identify ways to control membrane proteins, and hence to open possibilities of finding new drugs that are not antibiotics, which could help to fight the serious infections caused by *P. Aeruginosa*.

References : [1] Blackwood, L. L., and J. E. Pennington. 1981. *Infect. Immun.* 32:443–448 ; [2] Hancock REW *et al.* (1998) *Pseudomonas Biotechnology Handbooks* Vol. 10: Plenum, London; [3] Liguori L. *et al.* (2008). Liposomes-mediated delivery of proapoptotic therapeutic membrane proteins. *Journal of Controlled Release.* 126: 217-227

Ex vivo and in vivo non-invasive ultrasound-based cardiac pacing in pigs

Fabrice Marquet^{1,2,3}, Pierre Bour^{1,2,3}, Fanny Vaillant^{1,2,3}, Sana Amraoui^{1,4}, Rémi Dubois^{1,2,3}, Philippe Ritter^{1,5}, Michel Haïssaguerre^{1,4}, Méléze Hocini^{1,4}, Olivier Bernus^{1,2,3}, Bruno Quesson^{1,2,3}

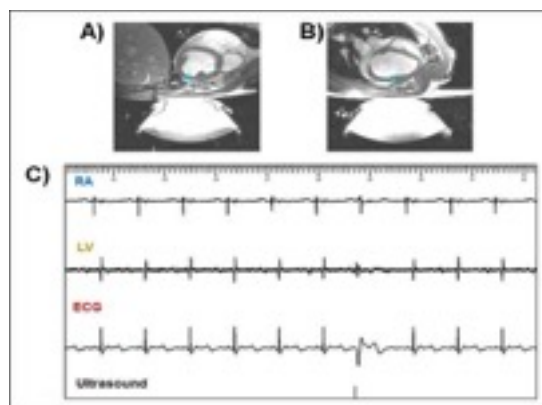
¹IHU Liryc, Electrophysiology and Heart Modeling Institute, fondation Bordeaux Université, F- 33600 Pessac- Bordeaux, France. ²Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France. ³INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France. ⁴Bordeaux University Hospital (CHU), Electrophysiology and Ablation Unit, F-33600 Pessac, France, Bordeaux University Hospital (CHU), ⁵Cardiac Electrophysiology and Cardiac Stimulation Team, F-33600 Pessac, France.

Currently, no non-invasive cardiac pacing device acceptable for prolonged use in conscious patients exists. The main approach is invasive, employing intravascular catheters, which has associated risks. Focused ultrasound can be used to perform remote pacing using reversibility of electromechanical coupling of cardiomyocytes. This technique might be useful in the short term in the clinical settings in various conditions: temporary pacing for bradycardia or any clinical condition with risks of asystole; terminating or examining the inducibility of tachyarrhythmia; screening and optimization of cardiac resynchronization therapy. Here we described an extracorporeal cardiac stimulation device and study its efficiency and safety.

Ex vivo acoustic stimulation threshold was determined performing 756 sonications in 10 pig beating hearts. In vivo non-invasive stimulation was performed using 314 sonications in 4 anesthetized pigs. The animals were injected with ultrasound contrast agents. Experiments were performed using a focused ultrasound device (256 elements, 13/13 cm aperture/focal, operating at 1 MHz) under MR-guidance. At the end of each in vivo experiment, a navigated delayed inversion-recovery 3D Flash sequence was performed. Masson's staining was performed to assess acute damages screening from acoustic stimulation of both ex vivo and in vivo experiments.

Using the ex vivo model, it was possible to study the stimulation threshold as well as different clinically relevant electrical effects such as consecutive stimulations of different heart chambers with a single ultrasonic probe, continuous pacing or the inducibility of ventricular tachycardia. Using ultrasonic contrast agent, consistent cardiac stimulation was achievable in vivo for up to 1 hour sessions in 4 different animals (see figure below). No damage was observed in inversion-recovery MR sequences performed in vivo in the 4 animals. Histological analysis revealed no differences between stimulated and control regions, for all ex vivo and in vivo cases.

To the best of our knowledge, this study is the first ex vivo and in vivo proof of feasibility of controlled non-invasive ultrasound-based cardiac stimulation in large animals. Preliminary safety results showed that this novel technology offers good prospects for clinical developments.



Effect of low-level laser therapy on human face aged skin and in viability of epithelioid human cells exposed to UV radiation

Sana Mezghani, Amira Hammami and Mohamed Amri

Laboratory of Functional Neurophysiology and pathology, Research unit, UR/11ES09, department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

Introduction: Both UVB and UVA radiation contribute to freckling, skin wrinkling, aging effects and the development of skin cancer. In this study, we assessed the putative effects of Low-level laser therapy (LLLT) on facial skin wrinkles using a human a model of aging persons. We also investigated the protective effects of LLLT against UVA or UVB-induced cytotoxicity and cell death of human epithelioid HeLa cells.

Materials and methods: Cell culture and treatment : One set of cells was exposed to UVB or to UVA and the other sets of cells were treated for 2 h with LLLT prior to or post UV radiation. At the end of the treatment, the cell number was determined by counting the viable cells. Cell cytotoxicity was quantified by measuring the lactate dehydrogenase (LDH). Clinical study: Ten female subjects aged from 40 to 65 years received LLLT. Irradiation was delivered to the face from a diode cluster head. The average energy density of the treatment was 27.77 J/cm²

Results: A women of 63 years old, treated with LLLT for 30 min/session exhibited a significant attenuation of wrinkles and crow's feet, lines were visibly smoothed and the skin's volume and elasticity was largely restored. In addition, the results showed that cell viability significantly decreased after UVA or UVB irradiation by 28.2% and 20.48%, respectively. However, the treatment of cells with LLLT prior to or post UVA or UVB irradiation increased cell viability (\approx 15%). Prior or post-treatment by laser radiation decreased the LDH leakage from cells exposed to UVA or UVB.

Discussion: Our results demonstrated that after the treatment with LLLT radiation, persons aged from 40 to 65 years showed a significant attenuation of their wrinkles and the skin's volume and elasticity was largely restored. Additionally, our investigation showed that the treatment of cells with LLLT prior to or post UVA or UVB irradiation increased cell viability. Taken together, the results demonstrated the beneficial effects of LLLT in relieving the signs of skin aging, and on the cellular level, LLLT has double effects, it prevented and also protected HeLa cells against UV-mediated cell death.

Libération contrôlée de la drogue par nano-couches uniformes des copolymères obtenus par plasma radio fréquence de basse pression

M. Mirshahi¹, F. Valamanesh¹, S. Batth², R. Lo Dico¹, J. Pulpyte², M. Pocard¹, F. Arefi-Khonsari²

¹*Sorbonne Paris Cité, UMR Univ. Paris 7, INSERM U965 L'Hôpital Lariboisière, Paris France.* ²*UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, Paris, France*

But: Utilisation d'un procédé sec et sans solvant par flux de plasma en vue de déposer et protéger des nano-couches de médicaments anti cancéreux sur une membrane permettant une libération contrôlée de la drogue.

Matériaux et méthodes: Polymérisation par flux de plasma de PCL-co-PEG [(poly (ϵ -caprolactone) - poly (éthylène glycol)] à une faible pression atmosphérique (3×10^{-2} mbar) pour un dépôt multicouches de médicament anti cancéreux (cis-platine) sur membrane de cellulose biocompatible (cellophane). Le plasma a été généré par réacteur du Radio fréquence à quartz. Le chargement du cis-platine sur des membranes de cellophane a été déterminé en mesurant l'absorbance entre 200-500 nm en utilisant un spectromètre UV-Vi. La composition de la membrane avec ses multicouches et leur interaction avec des cellules cancéreuses a été observé par la microscopie électronique à balayage. L'effet du cis-Platine incorporé par flux de plasma sur membrane de cellophane a été étudié 1) *in vitro* par mesure de la cinétique de libération du médicament incorporé dans la cellulose à partir des nano-couches de revêtements PCL-co-PEG., et par modification de l'adhésion et de la prolifération cellulaire de lignées de cellules cancéreuses (cancer de l'ovaire, OVCAR-3 NIH) déposées sur membranes chargées ou non chargées avec le cis-Platine, évaluées par coloration hémateïne-éosine-safran après 2, 24 et 48 heures. 2) *in vivo*, des études bio-pharmacologiques ont été réalisées par implantation de la cellophane traitée et non traitée (1 cm^2) sur le lobe hépatique de la souris ($n=20$) dans différents conditions. L'effet *in vivo* du médicament délivré à partir de la membrane a été étudié par analyse anatomo-pathologique des lames du foie après 10 jours d'implantation. La présence d'apoptose dans les zones traitées a été étudiée par la méthode TUNEL détectant la fragmentation de l'ADN.

Résultats: 1) *In vitro*, le cis-platine inclus sous forme de nano-couches par PCL-co-PEG sur les membranes de cellophane ne modifie ni la flexibilité, ni la rigidité ni l'aspect fonctionnel de la membrane. Par la microscopie électronique, les nano-couches (78 nM) et leur interaction avec les cellules est bien identifiable. L'adhérence et la prolifération des cellules déposées sur les membrane chargées en cis-Platine étaient diminuées par comparaison avec l'adhérence et la prolifération des cellules déposées sur les membranes non chargées en cis-Platine. 2) *In vivo*, lorsque les implants non chargés en Cis Platine ont été utilisés, la capsule de Glisson et le parenchyme du foie étaient intacts après 10 jours. Au contraire, lorsque les implants sont chargés en cis-platine, la capsule et le parenchyme ont été endommagés. Par contre dans tous les cas, les tissus et les cellules inflammatoires ont été observées dans les zones de contact entre l'implant et le parenchyme hépatique.

Conclusion: Les procédés RF-plasma de dépôt de (co)polymères permettent d'obtenir des revêtements d'épaisseur uniforme (nano-couches) en (co)polymères sur une variété de membranes. Cette méthode permettra d'obtenir des matériaux (bio-polymères) de haute pureté sans solvant pour différentes applications cliniques et biologiques et devrait être très utile dans la délivrance prolongée des médicaments dans le domaine biomédical.

Antiviral monoclonal antibodies: can they be more than simple neutralizing agents?

Mireia Pelegrin, Mar Naranjo-Gomez, Jennifer Lambour, Henri-Alexandre Michaud, Laurent Gros, Roudaina Nasser, Claire Tolza and Marc Piechaczyk.

Institute of Molecular Genetics of Montpellier, UMR 5535 CNRS, 1919 Route de Mende, 34293, Montpellier Cedex 5, France; University of Montpellier, 163 rue Auguste Broussonnet, 34090 Montpellier, France

Résumé : Monoclonal antibodies (mAbs) are increasingly being considered to fight severe viral diseases. Notably, the number of antiviral mAbs developed in the past 10 years has grown exponentially, including second-generation mAbs with improved neutralizing potential as well as mAbs directed to new viral targets. However, most mAbs-based immunotherapies conducted so far have only considered the blunting of viral propagation but not the other possible therapeutic effects independent of virus neutralization, namely the modulation of the endogenous immune response. Using a murine preclinical model of persistent retroviral infection, we have proven the concept that short mAb treatments can induce life-long protective immunity (« vaccine-like effects ») by enhancing the host humoral and cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. We have shown that this direct immunomodulatory action of the therapeutic mAb is borne by the Fc fragment through FcγR-binding effector functions. More specifically, the initiation of protective immunity relies on immune complexes formed between the administered mAb and infected cells (rather than those made with virions) that enhance antiviral CTL responses through FcγR-mediated binding to dendritic cells (DCs). Interestingly, the administered mAb mediates lysis of infected cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), which most probably provides an inflammatory milieu with adjuvant properties to DCs. We have also observed that mAb treatment results in a Fc-dependent early control of regulatory T (Treg) cells that are clearly involved in the immune evasion observed in absence of immunotherapy. Finally, we have recently shown a clear contribution of type I interferon (IFN-I) in the induction of vaccine-like effects by antiviral mAbs in our retroviral infection model. Altogether, these results might open a new avenue for the design of mAb-based antiviral therapies as, thus far, the immunomodulatory potential of mAbs has mostly been overlooked. This concept is all the more important to be taken into consideration that vaccine-like effects of anti-HIV mAbs have recently been suggested in preclinical models of HIV infection in young macaques. Importantly, it may equally apply to anti-cancer immunotherapies, as vaccine-like effects of anti-tumoral mAbs have also recently been reported

références : Pelegrin, M, Naranjo-Gomez and Piechaczyk, M (2015) Trends in Microbiology, Oct;23(10): 653-65. Pelegrin, M., Gros, L. and Piechaczyk, M. (2013) Med Sci 29(5):457-60. - Nasser, R., Pelegrin, M., Plays, M., Gros, L. and Piechaczyk, M. (2013) Blood 121 :1102-11 Michaud HA., Gomard T., Gros, L., Thiolon K., Nasser R., Jacquet C., Hernandez J., Piechaczyk M. and Pelegrin M. (2010) PLoS Pathog. Jun 10;6(6):e1000948.

Metallic Particles generated during Electric Pulses enhance Adenovirus-mediated Gene Transfer

T. Ragot¹ et L.M. Mir¹

¹Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR8203, CNRS, Univ. Paris-Sud, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805, Villejuif, France.

Résumé: Le transfert de gènes dans les cellules et les tissus en appliquant des impulsions électriques est de plus en plus attractif du fait de la sécurité de la méthode et de l'amélioration de l'efficacité des protocoles utilisés. Cependant, le mécanisme de franchissement de la membrane plasmique par l'ADN durant l'application d'impulsions électriques n'est pas encore complètement connu et plusieurs hypothèses sont proposées. Afin d'en apprendre plus sur le (ou les) mécanismes impliqués dans la pénétration cellulaire dans le cas d'un autre «gros» complexe moléculaire, nous avons appliqué diverses impulsions électriques à des cellules en suspension durant une infection par un adénovirus humain recombinant exprimant la GFP.

Nous observons une augmentation importante de l'expression du gène porté par le virus uniquement quand des impulsions de bas voltage et de plusieurs millisecondes sont appliquées à des cellules qui sont normalement difficilement infectées par le virus (récepteur de l'adénovirus peu ou pas exprimé à la surface des cellules). Nous avons démontré que les grandes quantités de particules métalliques, générées par l'électrolyse des électrodes durant l'application de ce type d'impulsion, sont responsables de l'effet observé. En effet, si le milieu d'infection est soumis aux impulsions séparément (sans les cellules) et ajouté ensuite aux cellules, la même augmentation de l'expression génique est observée. De plus, à une multiplicité d'infection du virus donnée, l'effet est proportionnel à la quantité de particules métalliques ajoutée. Enfin, après centrifugation de la solution d'infection soumise aux impulsions électriques, le virus est retrouvé associé aux particules métalliques formant le culot. Nous cherchons à comprendre la structure du complexe particules métalliques/virus et le processus aboutissant à l'augmentation finale du transfert de gènes.

MR-Guide Radiation Therapy for brain tumor and metastases: from chalkboard to bedside

L Sancey^{1,2}, S Kotb¹, C Verry³, F Lux¹, G Le Duc⁴, O Tillement¹.

¹Institut Lumière Matière UMR5306 Lyon, ²Institute of Advanced Biosciences UI209 UMR5309 UGA Grenoble, ³Radiotherapy Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, ⁴NH Theraguix, Atrium, 69622 Villeurbanne

Introduction: More than half of all clinical cancer patients undergo radiation therapy. Besides the poor prognosis for multiple brain metastases and brain tumors, the delivery of curative radiation dose to induce tumor-kill is strongly restricted by the healthy proximal brain. We describe a nanoparticle which can act as MR contrast agent and radiosensitizer concomitantly, for the detection, treatment and monitoring of brain cancers ¹.

Methods: Biodistribution, toxicity and pharmacokinetic studies were carried out in rodents and cynomolgus monkeys to demonstrate the safety of the nanoparticles after intravenous injection. The MR imaging properties of the nanoparticles were used to monitor their tumor accumulation in rodent bearing brain tumors. *In vitro* and *in vivo* efficacy of the nanoparticles was evaluated in rodent bearing brain tumors. Patients with multiple brain metastases fitting the eligibility criteria will be enrolled in the first-in-man phase I trial.

Results: The regulatory toxicity investigations demonstrated the absence of any antemortem or postmortem finding in rodent and nonhuman primates after repeated administration of nanoparticles; thus, the no-observed-effect level (NOEL) was determined and a human equivalent dose of 120 mg/kg was defined. In rodents, MR imaging indicated the renal elimination of the nanoparticles and their passive accumulation in the tumor region for several hours. The combination of nanoparticles and irradiation created significant dose enhancement *in vitro*, and improved the survival of rodent bearing aggressive brain tumor²⁻⁵.

Conclusions: The therapeutic efficacy of the nanoparticles has been demonstrated in aggressive pathologies, *i.e.* multiple brain metastases and brain tumors. In addition, the nanoparticles possess natural T1-MRI contrast agent properties, conferring a dual-property for image-guided radiation therapy. The data in rodents and nonhuman primates clearly substantiates and justifies their clinical translational potential. The upcoming first-in-man clinical trial will investigate both imaging and radiation therapy improvement for advanced precision medicine.

Acknowledgement

Financial support: PRIMES (ANR-11-LABX-0063), ANR-12-RPIB-0010 Multimage.

References:

- [1] Lux F. et al. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(51):12299-303.
- [2] Sancey et al. *Br J Radiol.* 2014;87(1041):20140134.
- [3] Le Duc et al. *ACS Nano.* 2011;5(12):9566-74.
- [4] Sancey et al. *ACS Nano.* 2015;9(3):2477-88.
- [5] Kotb et al. *Theranostics* 2016;6(3):418-27.

Squalene-based nanoparticles of siRNA for the treatment of prostate carcinoma harbouring TMPRSS2-ERG fusion oncogene

G. Urbinati¹, H.M. Ali¹, D. Desmaële², P. Couvreur², L. Massaad-Massade¹

¹UMR 8203 CNRS, laboratory of Vectorology and anti-cancerous therapeutics, Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; ²UMR 8612 CNRS, Institut Galien, 5, rue Jean-Baptiste Clément 92296 Chatenay-Malabry France.

Summary : Prostate cancer (PCa), an androgen-dependent tumour pathology, is the most frequent cancer in men (27% of all cancers in men) and represents the 4th cause of mortality by cancer and the 2nd in men. The conventional treatment for prostate cancer is androgen deprivation therapy; however, despite a high response to the treatment during the first months, 50% of prostate cancers progress to a castration resistant status. Thus, the introduction of new therapies based on the molecular status of PCa becomes necessary. PCa is characterized in 50% of cases by a predominant molecular subtype expressing the TMPRSS2-ERG fusion oncogene and this event represents a promising target for novel therapies. Indeed, we developed siRNA targeting TMPRSS2-ERG fusion oncogene to specifically knockdown the fusion product within the tumours.

The VCaP cell line harboring TMPRSS2-ERG fusion oncogene was used as a model of this study and we designed siRNAs within the expressed junction sequences. We showed that our siRNAs are able to inhibit specifically the TMPRSS2-ERG expression. Moreover, a high anti-proliferative effect by decreasing cell viability and by increasing apoptosis was observed. However, the *in vivo* administration of siRNAs is a major challenge because their biological efficacy is hampered by a poor stability in biological environments. It is therefore necessary to implement methods for their protection.

To protect and deliver siRNAs, we covalently linked them to the squalene (SQ) and the resulting bioconjugate was able to self-assemble into stable nanoparticles (NPs). The siRNA TMPRSS2-ERG SQ NPs were injected intravenously in mice and were able to reduce drastically the tumour growth in VCaP xenografts following the inhibition of TMPRSS2-ERG oncogene and oncoprotein (Urbinati et al., Plos one, 2015). Then, we associated the siRNA TMPRSS2-ERG-SQ NPs with flutamide (FLU), one of the gold standard treatment for PCa. The association of siRNA TMPRSS2-ERG-squalene nanoparticles with FLU displayed similar tumor growth inhibition as mice treated with siRNA TMPRSS2-ERG-squalene nanoparticles alone and was paralleled with modification of expression of ERG, androgen receptor, and cleaved-caspase-3 confirming the strong antitumoral activity of siRNA TMPRSS2-ERG-SQ NPs (Urbinati et al., MTNA, 2016).

In conclusion, our results showed that siRNA TMPRSS2-ERG-SQ NPs could be considered as an alternative therapeutic approach for hormone-dependent prostate cancer. This can open new therapeutic perspectives for the use of siRNA-squalene nanoparticles as an innovative personalized nanomedicine for patients affected by cancer pathologies harbouring fusion oncogenes.

Thématique

« Imagerie Biomédicale »

Sub second simultaneous displacement and temperature MR imaging during HIFU ablation

Pierre Bour^{1,2,3}, Fabrice Marquet^{1,2}, Valéry Ozenne^{1,2}, Solenn Toupin^{1,2,4},
Erik Dumont³, Matthieu Lepetit-Coiffe⁴ and Bruno Queson^{1,2}

¹IHU Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque, Fondation Bordeaux Université, Bordeaux, ²Inserm U1045 CRCTB, Université de Bordeaux, Bordeaux, ³Image Guided Therapy SA, Pessac, ⁴Siemens Healthcare, Erlangen

Introduction: MR-guided High Intensity Focused Ultrasound allows non-invasive ablation of pathological tissue. Temperature measurement via the Proton Resonance Frequency Shift along with online thermal dose calculation are principal monitoring parameters. Alternatively, the local displacement of soft tissues induced at the HIFU focal point by Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) can also be encoded. We propose a fast implementation of a simultaneous MR-ARFI/Thermometry allowing sub second multi-slice imaging during HIFU ablation. This would give additional quantitative data reflecting tissue elasticity modifications associated with temperature changes by remotely palpate the tissue at the focus. Evaluation *ex vivo* on pig muscle and *in vivo* on pig liver and feasibility on the brain of two healthy volunteers was performed.

Methods: A 1.5T MRI and a 256 elements HIFU transducer were used. A fast sequence was modified to insert a bipolar motion encoding gradient (MEG) to encode both information. The MEG direction, duration (Δ) and amplitude (A) were adjustable parameters and sonication were synchronized on MEG. Two HIFU shots, SARFI and SHERMO, with adjustable amplitudes were used.

-*Ex vivo*: 3 coronal slices, FOV= 92x147mm², voxel size=2.1x2.1x5mm³, refresh rate=1.25Hz

-*In vivo*: 3 coronal slices, FOV=156x170mm², 2.3x2.3x5mm³ voxel size, refresh rate=1Hz

A=25mT/m, Δ =5.3ms and δ = 3ms for the MEG

On human brain, mean standard deviation distribution, over 3 min acquisition on 10 slices was analyzed.

Results & Discussion: *Ex vivo* ablations (N=15) SARFI = 341W, SHERMO = 220W (electric) during 120s. At the end of sonication, a temperature increase of 15±0.4 °C was observed. Initial ARFI displacement measured was 30±1.6µm and progressively decreased to reach 23µm at the end of sonication.

In vivo ablations (N=10) SARFI = 810W, SHERMO = 810W (electric) during 30s. Apnea was maintained for 45s. At the end of sonication, a temperature increase of 25±0.8 °C was measured. ARFI displacement measured exhibited an increase then decrease pattern with a maximum of 80±1.8 µm and decreased to 31 µm at the end of sonication.

The median of mean standard deviation distribution for temperature and displacement remained respectively under 0.8°C and 2.5µm

In vivo and *ex vivo* ablations, a decrease in ARFI displacement was observed along the ablation attesting a stiffening of the tissue at the focus.

Spinal cord Magnetic Resonance Imaging at Ultra High Field (7T)

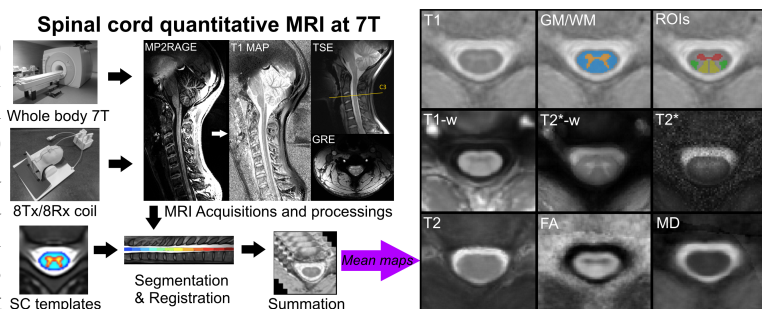
A. Massire^{1,2,4}, M. Taso^{1,2,3,4}, M. Guye^{1,2}, J-P. Ranjeva^{1,2,4} and V. Callot^{1,2,4}

¹ Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMBM), UMR 7339, CNRS, Aix-Marseille Université. ² Centre d'Exploration Métabolique par Résonance Magnétique (CEMEREM), Hôpital de la Timone, AP-HM, Marseille. ³ Laboratoire de Biomécanique Appliquée (LBA), UMR T24, Aix-Marseille Université, IFSTTAR, Marseille. ⁴ iLab-Spine : Laboratoire International Associé (LIA) en Imagerie et Biomécanique du rachis, France - Canada.

Introduction: Although quantitative MRI (qMRI) techniques have proven huge potentials to provide information about spinal cord (SC) pathologies from both microstructural and functional perspectives [1], there is still a strong need for pathological biomarkers and predictive factors of accurate prognosis. By enabling very high image resolution and enhanced tissue contrast acquisitions, ultra-high field (UHF) imaging offers new opportunities to investigate neurological diseases, as recently demonstrated in the brain [2]. In the SC, only few studies have been conducted so far, mainly reporting advantages for anatomical description [3,4]. The present work pushes forward SC qMRI at 7T by evaluating T_1 , T_2 and T_2^* relaxation times as well as fractional anisotropy (FA) and mean diffusivities ($\lambda_{//}$, λ_{\perp} , MD), on a cohort of healthy volunteers. The SNR available at 7T was traded to achieve very high in-plane and 3D spatial resolution compared to conventional clinical imaging, thereby enabling fine SC substructure findings. Such high-resolution morphometric and structural data pave the way for future clinical SC qMRI at UHF.

Methods: Experiments were performed on a whole-body actively-shielded 7T system with an eight-channel transceiver cervical SC coil array. Ten healthy volunteers (22±2 years) were scanned with approval of the local Ethic Committee. A sagittal 2D T_2 -weighted (T_2 -w) TSE sequence (spatial resolution 0.6x0.6x2 mm³) was used for accurate axial positioning. Quantitative mapping included a coronal 3D T_1 -w MP2RAGE sequence (0.7x0.7x0.7 mm³, C1-C7 coverage), as well as multi-slice axial 2D T_2^* -w GRE sequence (4 TE, 0.18x0.18x3 mm³), 2D TE-stepped T_2 -w segmented SE EPI sequences (4 TE, 0.8x0.8x3 mm³) and forward and reverse single-shot EPI Diffusion Tensor Imaging (DTI) (0.8x0.8x3 mm³, b-values (0,800) s/mm², 12 directions) at the C3 level. The total acquisition time, including B₀ shimming and B₁⁺ calibration, was 50 min/subject. Semi-automatic image post-processing was performed using the Spinal Cord Toolbox [5], Matlab (The Mathworks, Natick, USA) and FSL (FMRIB, Oxford, UK). Quantification within specific WM [6] and GM regions of interest (ROIs) were achieved after registrations of all parameter maps within a common reference space (MNI-Poly-AMU template [7]), non-linear co-registrations with the AMU40 template [8] and arithmetic sum on all subjects. Statistical analyses comparing the different regions of interest of the cord were based on paired t-test and HSD Tukey-Kramer test with JMP9 (SAS, Cary, USA) (p-values <0.05 significant).

Results: The figure below exhibits: (i) MP2RAGE-derived T_1 -w image (sagittal view), with spatial coverage from cerebellum to the upper thoracic level, (ii) corresponding T_1 map directly computed with Bloch equation, (iii) sagittal TSE and axial GRE acquisitions. Axial anatomical images (T_1 -w, T_2^* -w) and quantitative maps (T_1 , T_2^* , and FA) enabled excellent delineation of the GM butterfly and cord parenchyma (T_2 , MD). Quantitative group studies within specific ROIs led to identification of regional statistical differences, eg. between posterior/sensory and lateral/motor tracts.



Conclusion: For the first time, high-resolution qMRI data including $T_1/T_2/T_2^*$ relaxation times mapping and DTI metrics of the cervical spinal cord at 7T are reported (C3 level): clear delineation of the SC substructures (WM/GM) and regional statistical differences could be observed. Such ultra-high-field multi-parametric MR protocol opens great perspectives for further clinical investigations of SC degenerative and traumatic diseases. Further developments will now focus on protocols enabling multiple level investigations and parallel transmission pulse designs to release full potential of the coil.

References: [1] Wheeler-Kingshott, Neuroimage 2014. [2] van der Zwaag, NMR Biomed 2015. [3] Sigmund, NMR Biomed 2012. [4] Dula, Mult Scler 2015. [5] Cohen-Adad, OHBM 2014. [6] Lévy, Neuroimage, 2015. [7] Fonov, Neuroimage 2014. [8] Taso, Neuroimage 2015.

Acknowledgments: 7T-AMI ANR-11-EQPX-0001, A*MIDEX-EI-13-07-130115-08.38-7T-AMISTART, A*MIDEX ANR-11-IDEX-0001-02.

3D T2 mapping of the mouse brain at 7T using Spiral-In readout coupled with a stack-of-spiral approach.

Charles R Castets¹, Emeline J Ribot¹, William Lefrançois¹, Aurélien J Trotier¹,
Eric Thiaudière¹, Jean-Michel Franconi¹, Sylvain Miraux¹

¹ Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques UMR5536 CNRS/Université de Bordeaux

Background: Mapping the transversal relaxation time (T2) is a promising quantitative imaging technique particularly useful to visualize tissue lesions such as edema or metastases. The main drawback of T2 mapping is the acquisition time which is a limiting factor for high resolution 3D imaging. In this project we proposed to accelerate the T2 map acquisition by using a new sampling strategy based on multi-echo acquisition using an interleaved Spiral-In sampling coupled with a stackof-spiral method. The proposed method was validated on a mouse model of brain metastases at 7T.

Methods: All mice (n=5) were imaged on a 7T horizontal magnet (Bruker Biospin). The acquisition protocol was similar to the classic multi-echo protocol composed by a 90° pulse and followed by a train of 180° pulses. Each echo was sampled with spiral In gradient as previously developed by Hiba & al [1]. Acquisition was repeated several times to acquire 64 stack of spirals composed by 15, 10 or 5 interleaves. After image reconstruction each voxel was fitted with the following equation ($A \times \exp[-t/T2]$) using a Levenberg-Marquardt algorithm. The accuracy and robustness of this new procedure was first evaluated on phantom filled with various concentrations of Gadolinium (Gd-DOTA). T2 were measured using the gold-standard multi-slice multi-echo method (MSME) and with the proposed method. Then, this approach was tested *in vivo* on mice model with brain metastases.

The following imaging parameters were used: Matrix = 128x128x64; field-of-view = 20x20x15mm³; spatial resolution = 156x156x234 μm^3 , TR = 5000ms, 16 echo-images with TE increment of 12ms; Bandwidth = 300kHz; Flip-angle = 90°, refocusing pulse = 180°; number of spiral interleaves / stack = 15, 10, 5. Number of stack = 64. The overall exam time including image acquisition / reconstruction and T2 map reconstruction was around 60 minutes for the longer examinations.

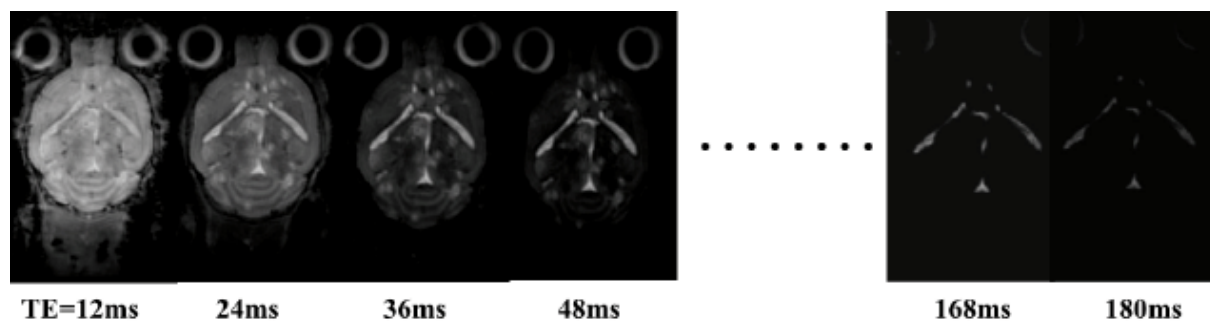


Fig.1: Extracted slices from 3D acquisition. Each images were spaced with a 12 ms delay allowing to visualize the T2 decay.

Results: Fig.1 showed mouse brain images obtained with the proposed method at various echo-time acquired with 15 interleaves per stack. The spatial resolution was high enough to properly visualize the mouse cerebellum. T2 map can be reconstructed using 15, 10 or 5 interleaves per stack enabling to decrease the overall acquisition time from 45 to 15 minutes. T2 on healthy part of the brain was : 43 ± 1.2 ms versus 54.2 ± 6.2 ms for the brain metastases as shown in Fig.2.

Conclusion: In this project we developed a new imaging protocol allowing fast T2 map acquisition based on spiral In acquisition coupled with a stack of spiral approach. This method allowed for the first time to obtain a high resolved 3D T2 map on mice with brain metastases.

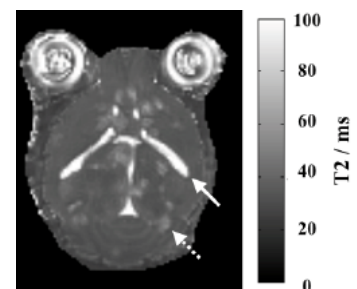


Fig.2: T2 map of a mouse brain with metastases. White arrow points at CSF. Dashed arrow points at a brain metastasis.

[1] Hiba B, Faure B, Lamalle L, Décorps M, Ziegler A. Out-and-in spiral spectroscopic imaging in rat brain at 7 T. Magn Reson Med. 2003

Imagerie ultrasonore super-résolue

C. Errico¹, J. Pierre¹, S. Pezet¹, Y. Desailly¹, Z. Lenkei¹, M. Tanter¹ et O. Couture¹

¹Institut Langevin (CNRS, ESPCI, INSERM)

Résumé : L'imagerie par ultrasons est réalisée en émettant des impulsions acoustiques et en analysant les échos des structures rencontrées. Comme les autres processus ondulatoires, la limite de résolution est de l'ordre de la moitié de la longueur d'onde ($\lambda/2$). Cette limite fondamentale restreint l'information que nous pouvons obtenir sur la microvasculature, jusqu'au capillaire, qui tient souvent la clé pour le cancer et les maladies cardiovasculaires.

En 2010, nous avons introduit le concept de microscopie par localisation ultrasonore (uULM). En s'inspirant des nouvelles techniques d'imagerie microscopique dynamique (FP ALM), nous avons proposé de n'activer qu'un nombre limité de diffuseurs à la fois afin de pouvoir distinguer le front d'onde individuel provenant d'une cible que l'on veut localiser. Le front d'onde n'étant plus une superposition de l'écho de plusieurs cibles, sa forme est précisément définie par la position d'un diffuseur distinct. Cette position peut être établie à quelques micromètres près, bien au-delà de la limite de diffraction. Si le diffuseur unique est une microbulle injectée dans le sang, cela permet de cartographier l'ensemble des vaisseaux sanguins avec une résolution de quelques microns à grandes profondeurs.

Nous avons d'abord démontré l'impact de la technique *in vitro* en injectant des microbulles dans des très fins canaux qui auraient, sinon, été impossibles à imager. Ensuite, nous avons décrit théoriquement les nouvelles limites de résolution de la superlocalisation. Cette étude a démontré que la résolution d'une barrette à 3MHz branchée sur un échographe ultrarapide devrait atteindre 10 microns.

Finalement, nous avons démontré la superlocalisation *in-vivo*. Nous avons effectué ce type d'imagerie sur des coupes coronales de cerveau de rat après une injection d'agents de contraste clinique. Nous avons pu observer les microvaisseaux les plus fins (moins de 10 micromètres) chez l'animal vivant (figure 1). De plus, nous avons pu mesurer des flux sanguins très lents, de l'ordre du millimètre par seconde, grâce au vecteur de propagation des microbulles individualisées.

Les applications d'une imagerie super-résolue du réseau vasculaire sont multiples. Une telle technique pourrait servir à cartographier la structure des nouveaux vaisseaux dans les tumeurs ou évaluer l'impact d'un infarctus dans le myocarde. Nous avons porté notre attention sur l'imagerie des accidents vasculaires cérébraux (AVC). D'abord, parce que les AVC représentent la deuxième cause de mortalité et la première cause d'handicap dans le monde. Ensuite parce que le traitement des AVC dépend fortement de la rapidité à laquelle son épice, ainsi que son type (ischémique ou hémorragique) sont identifiés. Finalement parce que le crâne représente une barrière pour les ultrasons qui les atténue, favorisant l'utilisation d'autres techniques d'imagerie telles que l'IRM et le scanner-X. Notre approche dénouant le compromis entre la pénétration des ultrasons et la résolution de l'imagerie pourrait permettre de reconstruire de fins vaisseaux dans le cerveau humain avec un appareil portable. A terme cela permettra de pouvoir prédire l'existence ou la formation de thrombus (précurseurs d'accidents vasculaires cérébraux), de pouvoir observer l'activité du cerveau humain sachant que le fonctionnement des vaisseaux sanguins est lié à l'activité neuronale, ou encore de pouvoir faire de l'imagerie moléculaire grâce à des bulles ciblées.

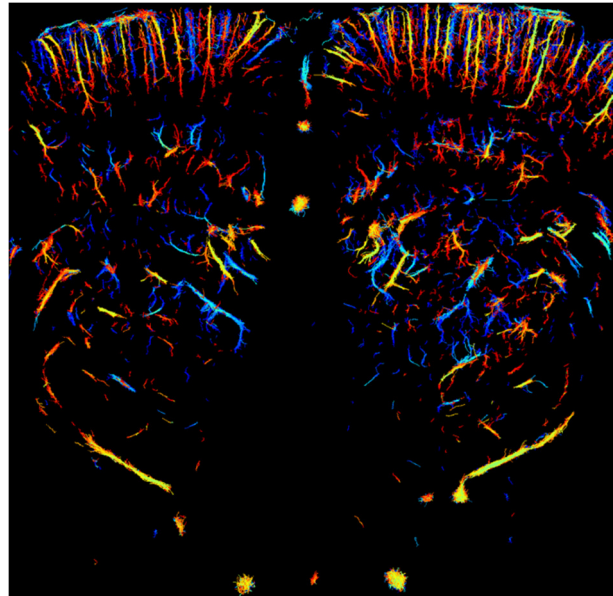


Figure 1: Ultrasound localization microscopy du cerveau de rat *in vivo*. Une résolution de 8 μ m est obtenue à une profondeur de plus de 1cm, montrant les capillaires [Errico et al., Nature, 2015]

**Transmissibilité de la pathologie Alzheimer chez les primates
par inoculation de cerveaux humains Alzheimer**

Charlotte Gary¹, James E. Koch^{1,2}, Fanny Petit¹, Zoe Hanss¹, Clement Garin¹, Anisur Rahman³, Sabiha Eddarkaoui⁴, Stephen J. Sawiak⁵, Anne-Sophie Herard¹, Jean-Philippe Deslys⁶, French Neuropathology Network⁷, Luc Buee⁴, Emmanuel E. Comoy⁶, Fabien Pifferi^{3,*}, Jean-Luc Picq^{8,*}, Marc Dhenain¹

¹UMR 9199 CEA CNRS, Fontenay-aux-Roses, France, ²University of Wisconsin Oshkosh, USA, ³UMR7179 CNRSMNHN, Brunoy, ⁴UMR-S1172, Inserm, Univ. Lille, France, ⁵University of Cambridge, Cambridge, UK, ⁶CEA, SEPIA, Fontenay-aux-Roses, ⁷UPMC, UMR S 1127, UMR 7225, et ICM, Paris, ⁸EA 2027, St-Denis. *Contribution équivalente. LB et MD sont tous deux chercheurs CNRS de la section 28

Après inoculation intracérébrale, des peptides amyloïdes ou tau mal conformés peuvent transmettre leur mauvaise conformation à des peptides natifs normaux (nucléation/propagation) et propager la pathologie dans le cerveau (Clavaguera 2009; Eisele 2014). Cette hypothèse a été démontrée chez des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer (MA). La pathologie amyloïde pourrait également être transmise chez l'homme lors de contamination iatrogène avec des tissus contaminés (Jaunmuktane 2015; Kovacs 2016).

Afin d'apporter la démonstration directe d'une possible transmission des peptides amyloïdes ou tau, chez les primates, nous avons inoculé des homogénats de cerveaux humains Alzheimer ou contrôles par voie intracérébrale à 12 jeunes microcèbes murins (âgés de 3 ans, n = 6/groupe) et avons effectué un suivi longitudinal des animaux pendant 18 mois (Gary 2015). Les animaux inoculés avec les cerveaux Alzheimer ont développé progressivement des troubles cognitifs affectant d'abord la mémoire à long terme puis les capacités d'apprentissage. Les profils d'électroencéphalogrammes (EEG) des animaux inoculés avec les cerveaux Alzheimer ont été progressivement déplacés vers des fréquences rapides par rapport à ceux des animaux inoculés avec des cerveaux contrôles, ce qui indique des altérations de l'activité neuronale. Les animaux inoculés avec des cerveaux Alzheimer ont également développé une atrophie du cortex cingulaire postérieur et rétrospinal ainsi que des régions adjacentes appartenant au connectome limbique (telles que l'hippocampe, le cortex entorhinal ou l'amygdale). Par immunohistochimie, nous avons détecté très peu de lésions amyloïdes (plaques amyloïdes et/ou angiopathie amyloïde) chez les animaux inoculés avec des cerveaux Alzheimer. Les animaux inoculés avec des cerveaux contrôles ne présentaient pas de lésions. Ces données suggèrent une atteinte morphofonctionnelle prédominante suite à l'inoculation de cerveaux humains Alzheimer chez des primates. Ces atteintes pourraient être liées à la présence de formes solubles de peptides amyloïdes ou tau mal conformés ou à l'initiation d'un processus inflammatoire entraînant une mort neuronale ou une atteinte synaptique.

Evaluation thérapeutique préclinique de la maladie d'Alzheimer
Intérêt des endophénotypes et imagerie des plaques amyloïdes par IRM
Marc Dhenain¹, Nachiket Nadkarni¹, Clémence Duffant¹, Steve Sawiak²,
Anne-Sophie Herard¹, Thomas Debeir³, Thomas Rooney³, Thierry Delzescaux¹

¹UMR-CEA-CNRS 9199, 92260 Fontenay-aux-Roses, ²University of Cambridge, Cambridge, Royaume-Uni,
³Sanofi, 91385 Chilly-Mazarin.

La maladie d'Alzheimer entraîne des altérations cognitives sévères et est caractérisée par des altérations endophénotypiques telles qu'un hypométabolisme ou une hypoperfusion cérébrale. Cette pathologie est également liée à l'accumulation de lésions microscopiques : les plaques amyloïdes qui apparaissent dans le cerveau des patients jusqu'à 15 ans avant le début de la phase clinique de la maladie. Le développement de nouveaux médicaments contre cette maladie repose en grande partie sur l'utilisation de modèles murins de la pathologie amyloïde. L'IRM peut permettre de suivre des atteintes endophénotypiques chez ces animaux. Par exemple, elle permet de révéler une hypoperfusion cérébrale et d'étudier les effets de thérapies sur cette perfusion. La charge amyloïde est quant à elle souvent étudiée par immuno-histologie. Cette méthode nécessite des analyses qui peuvent être longues et fastidieuses et ne permettent pas de réaliser un suivi longitudinal des lésions. L'IRM est une autre méthode permettant de quantifier la charge amyloïde. Elle peut détecter et quantifier les plaques amyloïdes, notamment grâce à des procédures d'analyse automatique. Elle peut permettre de réaliser un suivi longitudinal de chaque plaque amyloïde. Nous montrerons un exemple d'évaluation d'une immunothérapie anti-amyloïde grâce à des analyses par IRM et montrerons que cette méthode peut participer à l'évaluation de mécanismes d'action de la thérapie.

Inhomogeneous Magnetization Transfer (ihMT) MRI: from Arterial Spin Labeling (ASL) perfusion artifact to myelin-specific biomarker

G. Duhamel¹, O Girard¹, V. Prévost¹, and S. Mchinda¹

¹Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMBM), UMR CNRS 7339, Aix Marseille Université (AMU), Marseille, France

Introduction: In the early 2000s, strong efforts of the MRI community devoted to measurement of perfusion by ASL focused on developing reliable approaches that worked for large volume and multiple slices imaging, while keeping high labeling efficiency. A particular approach on which we worked during my postdoctoral position at BIDMC (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Dir. Pr. D.C. Alsop) was based on modulation of the amplitude of the effective field achieved by simultaneous and similar modulation of the RF amplitude, RF frequency and gradient (1). This method relied on the equivalence of MT effects between label experiment (RF applied alternatively between positive & negative frequencies) and control experiment (RF applied at positive frequency). Initial testing highlighted a systematic slight signal offset in white matter (WM), initially considered as an MT asymmetry effect. However, further analysis performed outside the framework of ASL concluded on a more substantial error, which revealed specificity about WM. And so was born *inhomogeneous Magnetization Transfer (ihMT)* (2). From then, a gradual and continuous process of understanding, testing, and improving, performed by the CRMBM project-team dedicated to this field of research in close collaboration with the team of Pr. Alsop, led to appreciation of the physics and meaning of this new endogenous MR contrast.

ihMT Principle & signal origin: ihMT reflects the difference in saturation transfer between single and dual frequency off-resonance saturation and reveals non-zero signal only in inhomogeneously dipolar-broadened macromolecular lines (3). In lipid membranes, highly present in myelin, the rapid, axially symmetric rotation of the molecules about the local bilayer normal aligns the residual dipolar interaction along this axis, further reducing the broadening of the line to an inhomogeneous broadening, and hence, the ihMT technique has shown apparent specificity for myelinated tissues (4, 5) (Fig. 2).

ihMT Project: ihMT is a new contrast, and as such, its underlying mechanisms need to be characterized. In parallel, its usefulness for clinics, that is, its sensitivity for pathology and its capacity for better WM characterization need to be evaluated. Hence, the ihMT project developed by the CRMBM team is composed of two translational axes, at the interface of fundamental research-physical characterization of the ihMT contrast- and clinical research -assessment of the ihMT sensitivity in the clinical context. A recent experimental analysis of potential confounding factors (6) along with a theoretical model, which interprets the ihMT signal as a dipolar order effect within motion restricted molecules (7) illustrate our advances in the understanding of ihMT mechanisms. Interestingly, the dipolar order associated to the model decays with a dipolar relaxation time, T_{1D} , which is function of both dipolar coupling strength and molecular motions. These properties make ihMT contrast sensitive to slow molecular dynamics within lipid membranes and open new perspectives for *in vivo* lipid order parameter measurements. On the clinical side of the project, preliminary studies performed on Multiple Sclerosis patients (8) provided promising results in terms of sensitivity for pathology, as illustrated by differences in ihMT ratio values between controls and patients (Fig.3), which further appeared more pronounced in patients who presented highest clinical scores (Primary Progressive patients, PP).

Conclusion: ihMT is a new endogenous MR contrast, specific biomarker of myelin, which bears great potentialities for both fundamental research and clinical research.

References: 1) DC Alsop, Proc. ISMRM 9 (2001) 1562; 2) DC Alsop, et al Proc. ISMRM 11 (2004) 2324; 3) G Varma, G Duhamel, et al MRM (2015) 73:614–622; 4) O.M. Girard, et al MRM (2015) 73:2111–2121; 5) O.M. Girard, et al MRM (2016), DOI 10.1002/mrm.26134; 6) V.H. Prevost, et al MAGMA (2016) DOI10.1007/s10334-015-0523-2; 7) G. Varma, et al JMR (2015) 260:67–76.; 8) G Duhamel, et al, Proc. ISMRM 23 (2015) 4346

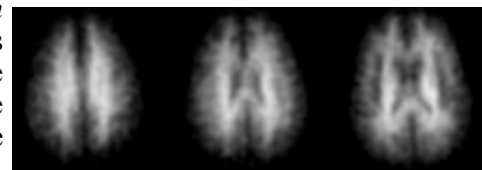


Fig.1. First human brain ihMT images

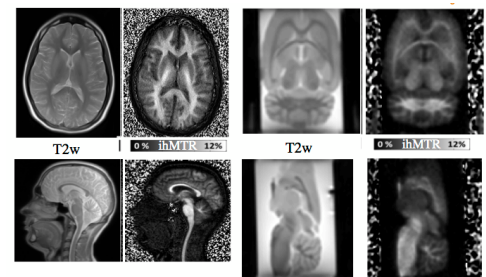


Fig.2. Human and rat ihMT images obtained at 1.5T and 11.75T

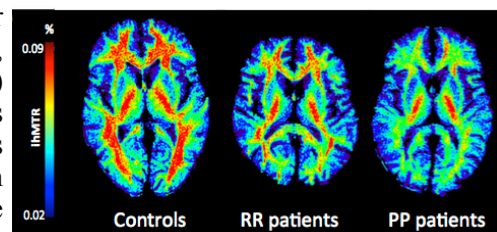


Fig.3. Sensitivity of ihMT for MS pathology

Localization and quantification of intramuscular damage using statistical parametric mapping and skeletal muscle parcellation

A. Fouré^{1,2}, A. Le Troter¹, M. Guye^{1,3}, J-P. Mattei^{1,4}, D. Bendahan¹, J. Gondin¹

¹Aix-Marseille Université, CNRS, ²Siemens Healthcare, ³APHM, Hôpital de la Timone, ⁴APHM, Hôpital de Sainte Marguerite

Introduction : Magnetic resonance imaging is a method of choice to investigate in vivo the extent of muscle damage in healthy subjects or patients with neuromuscular diseases. The increase in muscle proton transverse relaxation time (T_2) has been identified as a relevant biomarker of muscle damage illustrating inflammatory/edematous processes. Although local T_2 changes have been previously assessed among and along damaged skeletal muscles, no study provided accurate information on the 3D localization and extent of intramuscular damage.

Aim : To objectively and accurately localize and quantify the extent of tissues alterations within the four heads of the quadriceps femoris (QF) using an original and robust methodology which combines the spatial normalization of skeletal muscle MR images, the statistical parametric mapping (SPM) analysis and the use of a specific muscle parcellation.

Methods : T_2 maps of QF muscles were characterized before, two (D2) and four (D4) days after 40 maximal isometric electrically-evoked contractions inducing muscle damage in 25 healthy young males.

Results : On the basis of SPM analysis of coregistrated T_2 maps, the alterations were similarly detected at D2 and D4 in the superficial and distal regions of the vastus medialis whereas the proportion of altered muscle was higher in deep muscle regions of the vastus lateralis (VL) at D4 (deep: $35 \pm 25\%$, superficial: $23 \pm 15\%$) as compared to D2 (deep: $18 \pm 13\%$, superficial: $17 \pm 13\%$).

Discussion & Conclusions : This original method clearly illustrates that deep muscle areas of the VL were mainly altered likely due to potential shear stress imposed during the damaging exercise. The present methodology used for the first time on skeletal muscle would be of utmost interest to detect subtle intramuscular alterations for the diagnosis and to quantify the severity/progression of muscular diseases but also for assessing the efficacy of potential therapeutic interventions and clinical treatment strategies.

Detection of dentate gyrus disruption in experimental multiple sclerosis using diffusion tensor MRI

V Planche^{1,2,3}, A Panatier^{1,2}, N Cassagno^{1,2}, A Desmedt^{1,2}, S Oliet^{1,2}, V Dousset^{1,2,4}, T Tourdias^{1,2,4*} and B Hiba^{2,5}

¹INSERM, U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France; ²Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ³CHU de Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ⁴CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France ; ⁵CNRS UMR 5287, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, F-33000, Bordeaux, France

* both authors supervised jointly this work

Introduction: Memory impairment is an early and disabling manifestation of multiple sclerosis whose anatomical and biological substrates are still poorly understood. We thus investigated, in a mouse model of multiple sclerosis (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), whether some hippocampal regions could be more vulnerable than others to early pathophysiological process. High sensitivity diffusion-tensor MRI method was used to analyses non-invasively the microstructure of hippocampus layer-by-layer.

Results: We first demonstrated that hippocampal-dependent memory was impaired at the early stage of EAE. *In vivo* diffusion-tensor imaging (DTI), acquired at very high resolution (80 micrometer), unrevealed a selective vulnerability in the molecular layer of the dentate gyrus of EAE-mice. This vulnerability was due to a selective neurodegenerative process in this structure, as confirmed by histological and morphometric analyses. In addition, glutamatergic synaptic transmission and long-term synaptic potentiation were selectively impaired in the dentate gyrus but not in CA1. Importantly, as we found strong and diffuse microglial activation, we performed daily intra-peritoneal injections of the microglial inhibitor minocycline. This treatment prevented DTI, morphological, electrophysiological and behavioral impairments in EAE-mice. Furthermore, the selective inhibition of microglial activation by daily infusions of minocycline specifically within the dentate gyrus was sufficient

Conclusion: These results demonstrate that memory impairment at the early stage of EAE is due to a selective disruption of the dentate gyrus caused by microglial activation, which should be considered for future therapeutic strategies.

Experimental sepsis-associated encephalopathy is characterized by altered brain perfusion and structure: a combined magnetic resonance imaging and histology study

I. Dhaya, M. Griton, G. Raffard, J. Badaut, B. Hiba, J. P. Kongsman

CNRS UMR 5536 Magn. Reson. Biol. Syst., Univ. Bordeaux, Bordeaux, France CNRS UMR 55287 INCLIA, Univ. Bordeaux, Bordeaux, France

Summary: Sepsis-associated encephalopathy (SAE) refers to brain dysfunction during systemic inflammation, which can range from mild delirium to coma. In spite of its clinical relevance and poor outcome, SAE remains poorly understood even though magnetic resonance imaging (MRI) in septic patients has provided indications of reduced cerebral blood flow and diffuse grey and white matter edema. In the present work, we combined *in vivo* advanced MRI modalities and *post mortem* histology to study the brains of the same animals 24h after induction of sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) in an attempt to better understand the pathophysiology of SAE. Sepsis was accompanied by the classical signs of sickness behaviour, such as lethargy and reduced food intake, but also by reduced reflexes indicating nervous system dysfunction. Assessment of cerebral perfusion with Arterial Spin Labeling (ASL) revealed that the cortex of animals that underwent CLP received less blood relative to the whole brain compared to sham surgery. T2 MRI indicated the presence of more water in the cerebral cortex after CLP than after sham surgery. Diffusion Tensor Imaging (DTI) showed increased water diffusion parallel to the fibers of the corpus callosum after CLP as compared to sham surgery. These *in vivo* imaging findings indicating both functional and structural CNS changes during experimental sepsis. We are currently studying on brain sections of the same animals to what extent these changes are linked to perivascular prostaglandin and NO production, blood-brain barrier breakdown and glia cell responses affecting water diffusion. In conclusion, our work reproduces MRI observations of clinical SAE and expands them to ASL and DTI in an animal model. The changes in cerebral ASL and DTI found during experimental sepsis and the associated histological changes in the brains of the same animals will improve our understanding of the pathophysiology of SAE.

High resolution Magnetic Resonance Imaging (MRI) combined with Magnetization Transfer (MT) for the visualization of the cardiac structure: an ex vivo proof of concept

J. Magat¹, A.Fouillet¹, J. Naulin¹, D.Benoist¹, Y. Guo¹, O. Bernus¹, B. Stuyvers¹, B.Quesson¹

¹IHU, Fondation Bordeaux Université, U1045 CRCTB, Université de Bordeaux, France

Résumé : The Purkinje conduction network plays a crucial role in normal cardiac function but has also been implicated in arrhythmogenesis and sudden cardiac death. Free running fibers are present inside the ventricle and connect to the myocardium at different entry points before subdividing to form a tree inside the cardiac muscle and allow propagation of the electrical impulse that triggers the mechanical contraction of the cardiac chambers. 3D imaging of its architecture¹ is therefore of high importance to better understand propagation patterns in cardiac arrhythmias and improve their diagnosis and treatment. Most commonly used techniques to study cardiac electrical conduction system remain destructive: histological sectioning, endocardial staining or ink injection². In order to address this challenging problem, we investigate the possibility to exploit high field (9.4T) MRI to acquire high resolution images of ventricular myocardium. Since Purkinje fibers (PF) have a distinct cellular structure and are surrounded by connective tissue, we propose to use the

Magnetization Transfer (MT) imaging technique³. The aim of this study was to optimize MT parameters to enhance contrast between collagen fibers (surrounding PF) and myocardium. A 40 kg mal pig was anaesthetized and the heart was removed (sternal thoracotomy), flushed with cold cardioplegic solution and immersed in 4% formaldehyde in PBS. A sample of anterior left ventricle including interventricular septum was selected (3x4.5x8 cm) displaying several free-running Purkinje fibers in the endocardium at visual inspection. The cardiac structure was assessed through 2D T1w images TE/TR/matrix/TA/NA/ α =4.4ms/2s/150x225/1h40/15/75° with a resolution of 200x200x500 μ m. A preparation module of MT of 250 msec in duration was inserted into the sequence with a B1=10 μ T and frequency offset=2500 Hz. The same acquisition was repeated with the MT module. Without MT module (Fig.1.1), almost no contrast appears on the image, whereas several tissue structures appear in presence of MT (Fig. 1.2). The contrast between sub-endocardium and free-running structures, where Purkinje fibers are likely present (red arrows), and adjacent tissue (yellow arrow) was 2.9% (no MT) and raised to 45% with MT. First results of MT technique show an improved contrast in ex vivo heart tissue. Although all tissues exhibited a reduction in SNR in presence of MT, the contrast between PF and the cardiac tissue has been increased by more than 50% as compared to standard proton density weighted sequence. The decrease in SNR was expected since structural proteins (typically collagen) are present everywhere in the cardiac muscle. Fibrous structures are well defined in the myocardium and are associated

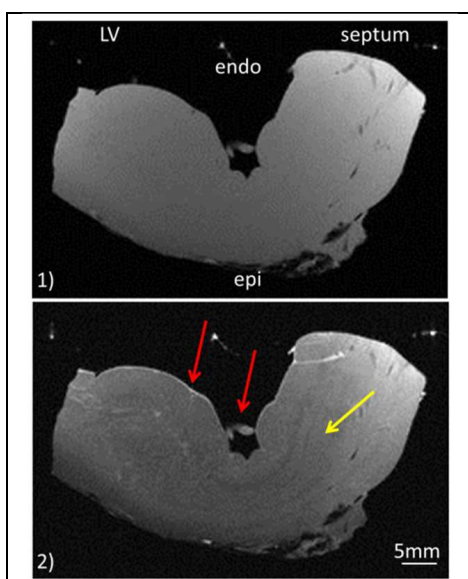


Figure 1: anterior LV sample. 1) T1w image without MT 2) MT preparation applied with increased tissue contrast (see text for details).

to collagen fibers which are structural proteins surrounding PF. However, additional analyses have to be investigated such as histology, to confirm the nature of structural patterns and fibers orientation in the tissue. MT significantly improves contrast in ventricular myocardium and appears promising in imaging the 3D architecture of the Purkinje network.

Références : [1] Elsika O., Casopis Lekarů Ceskych 2006, 145, 329–335. [2] Henkelman R.M., et al. NMR Biomed 2001, 14, 57-64.

Detection of cerebellar hyperintensity on unenhanced MR images at 7T after cumulative injections of gadodiamide in healthy rats

S. Mème¹, D. El Hamrani¹, V. Vives², W. Mème¹, P. Robert²

¹Centre de Biophysique Moléculaire CBM CNRS UPR4301, Orléans. ²Guerbet, Research and development department, Aulnay

Purpose: Several studies have reported hyperintensity in cerebellar dentate nuclei on T1-weighted images both in humans (1-3) and rats (4-6) after multiple gadodiamide enhanced MR scans. This signal increase is significant after 6 injections for diseased patients with multiple sclerosis, oncological patients who undergone brain irradiation or patients with neurodegenerative and inflammatory disorders. The sensitivity of detection of this hypersignal depends may depend on many interdependent acquisition parameters such as magnetic field strength, sequence types and sequence parameters (7). The aim of this study was to evaluate DCN hyperintensity both with spin-echo and gradient-echo sequences at 7T in a rat model (4).

Materials and methods: Twenty five healthy rats were used in this study. They were divided into three groups: injected with gadodiamide (Omniscan®, GE healthcare), injected with saline and untreated controls. Rats received intravenously gadodiamide or saline injections four times a week during five weeks (total dose of gadodiamide in 20 injections: 12 mmol/kg). MR experiments were performed during the 6th and 11th week on a 7 T horizontal magnet (70/16 Bruker Pharmascan, Wissembourg, France) with a 40 mm inner diameter quadrature coil. Three different non injected sequences were used: a RARE T1-weighted sequence with short TR (TE/TR=10/525 ms), a RARE sequence with long TR (TE/TR=10/1000 ms) and a FLASH T1-weighted sequence (TE/TR=2.3/129 ms) producing respectively 512*512 and 256*256 images in 6 minutes, 15 minutes and 30 minutes.

Results: There was a significant increase in MR signal ($p=0.0001$) on Flash images in the DCN nuclei that lasted 11 weeks after the injection of gadodiamide. No significant increase was observed on RARE images either with short and long TR. There was no increase of the DCN signal 11 weeks after multiple saline injection ($p=0.153$). This was the same for control non injected rats (data not shown).

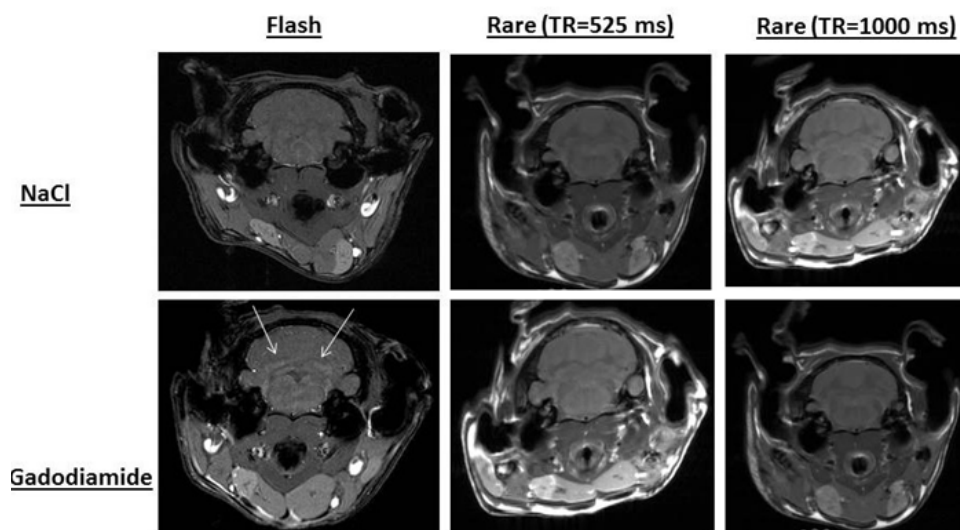


Figure: Typical FLASH and RARE images of a rat brain 11 weeks post injection

Conclusion: At 7T, T1-weighted gradient echo sequence was optimal as opposed to RARE T1w sequence for detection of DCN hypersignal after repeated injections of gadodiamide in healthy rats.

References: 1) Quattrocchi C. et al. Investigative Radiology 2015. 2) Errante Y. et al. Investigative radiology 2014. 3) Kanda T. et al. Radiology 2014. 4) Robert P. et al. Investigative Radiology 2015 Aug;50(8):473-80. 5) Robert P et al., Investigative Radiology 2016;51: 73–82. 6) Jost G. et al., Investigative Radiology 2016;51:83–89. 7) Kanda et al, American Journal of Neuroradiology, 37(1):E1-2. 2016.

Improved cardiac magnetic resonance thermometry and dosimetry for monitoring lesion formation during catheter ablation

V. Ozenne^{1,2}, S. Toupin^{1,2,3}, P. Bour^{1,2}, B. Denis de Senneville⁴, M. Lepetit-Coiffé³, T. Troadec^{1,2}, A. Vaussy^{1,2,3}, M. Boissenin^{1,2}, J. Benois-Pineau⁵, P. Jais^{1,6}, and B. Quesson^{1,2}

¹Institut Hospitalo-Universitaire, Liryc Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque, Fondation Bordeaux Université, Bordeaux, France. ²Inserm U1045 Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université de Bordeaux, Bordeaux, France. ³Siemens Healthcare France, Saint Denis, France. ⁴Mathematical Institute of Bordeaux, Bordeaux, France. ⁵LaBRI, CNRS, Université of Bordeaux. ⁶Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France.

Purpose: A new real-time MR-thermometry pipeline¹ was developed to measure multiple temperature images per heartbeat with $1.6 \times 1.6 \times 3$ mm³ spatial resolution. The method was evaluated on 10 healthy volunteers and during radiofrequency ablation (RFA) in sheep.

Methods: Multislice, electrocardiogram-triggered, echo-planar imaging was combined with parallel imaging, under free breathing conditions. In-plane respiratory motion was corrected on magnitude images by an optical flow algorithm. Motion-related susceptibility artifacts were compensated on phase images by an algorithm based on Principal Component Analysis. Correction of phase drift and temporal filter were included in the pipeline implemented in the Gadgetron framework². Contact electrograms were recorded simultaneously with MR thermometry by an MR-compatible ablation catheter.

Results: The temporal standard deviation of temperature in the left ventricle remained below 2 °C on each volunteer. In sheep, focal heated regions near the catheter tip were observed on temperature images (maximal temperature increase of 38 °C) during RFA, with contact electrograms of acceptable quality. Thermal lesion dimensions at gross pathology were in agreement with those observed on thermal dose images.

Conclusion: This fully automated MR thermometry pipeline (five images/heartbeat) provides direct assessment of lesion formation in the heart during catheter-based RFA, which may improve treatment of cardiac arrhythmia by ablation.

References: (1) Ozenne, V.; Toupin, S.; Bour, P.; de Senneville, B. D.; Lepetit-Coiffé, M.; Boissenin, M.; Benois-Pineau, J.; Hansen, M. S.; Inati, S. J.; Govari, A.; Jais, P.; Quesson, B. *Magn Reson Med* 2016. (2) Hansen, M. S.; Sorensen, T. S. *Magn Reson Med* 2013, 69, 1768.

Microspectroscopie et imagerie vibrationnelles :

Des outils photoniques d'intérêt en biologie et dans le domaine biomédical

O. Piot¹, P. Jeannesson¹, C. Gobinet¹, G. Thiéfin¹, V. Vuiblelet¹, S. Brassart-Pasco¹, S. Brézillon¹, G. Sockalingum¹

¹UMR CNRS 7369 MEDyC, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims.

Résumé: Cette présentation a pour objectif de montrer la nature des informations que permettent d'obtenir les techniques de microspectroscopie et d'imagerie vibrationnelles. Des exemples d'applications en biologie viendront illustrer le potentiel de ces approches. Le principe des spectroscopies vibrationnelles, absorption infrarouge et diffusion Raman, repose l'interaction non destructive de la lumière avec la matière. L'analyse spectrale de cette interaction, absorbée (infrarouge) ou diffusée (Raman), permet de sonder les vibrations des liaisons moléculaires de l'échantillon. Ces informations « label-free » (sans marquage) sont non seulement reliées à la composition moléculaire intrinsèque de l'échantillon, mais également à l'environnement chimique de chaque liaison moléculaire (liaisons hydrogènes, type de structure secondaire des protéines, organisation des lipides...). Le traitement des spectres par des techniques statistiques multivariées permet d'identifier des signatures spectrales spécifiques du statut physiologique ou pathologique du tissu, et indépendantes de la variabilité inhérente à la matière biologique.

Dans une première partie, quelques principes et bases instrumentales de ces techniques vibrationnelles seront présentées. Nous verrons ensuite que ces techniques peuvent être appliquées à différentes échelles: moléculaire, cellulaire, tissulaire voire in vivo directement sur l'organisme.

Au niveau moléculaire, l'exemple portera sur une analyse de glycation de l'ADN. Ce processus est susceptible d'engendrer des altérations moléculaires et par conséquent des pertes de fonctionnalité au niveau de l'ADN. Nous verrons que le signal Raman d'échantillons d'ADN ayant subi différents niveaux de glycation présente des modifications spectrales associées à des bases nucléiques précises. L'analyse du signal au moyen d'une méthode de corrélation 2D permet de mettre en évidence une certaine séquence d'altérations : par exemple la glycation affecte d'abord les bases Guanine, puis Adénine et enfin Cytosine.

Au niveau cellulaire, nous nous intéresserons au développement d'une plate-forme automatisée de diagnostic de cellules cancéreuses. L'exemple portera sur le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). L'objectif est de développer une machine intégrable dans le parcours clinique actuel, i.e. d'analyser des frottis sanguins réalisés en routine, sans préparation ni marquage particuliers.

Au niveau tissulaire, nous définirons « l'histologie spectrale », concept de micro-imagerie tissulaire permettant non seulement une localisation et identification précise des zones tumorales, mais également une caractérisation du microenvironnement tumoral. Par exemple, nous verrons qu'il est possible de distinguer automatiquement des carcinomes cutanés de type baso- et -spinocellulaires. Cette approche permet aussi de mettre en évidence une hétérogénéité tumorale qui, dans le cas des mélanomes et des cancers coliques, apparaît être reliée à l'agressivité des lésions. De plus, pour l'étude du vieillissement cutané, des informations sur la structure du réseau de collagène et sur les interactions eau/collagène peuvent être extraites tout en conservant l'intégrité tissulaire. Cette « histologie spectrale » a pu être étendue à d'autres problématiques telles que la quantification automatique de la fibrose et de l'inflammation dans le rein.

De par leur accessibilité et leur rôle physiologique, les biofluides sont des échantillons d'intérêt pour la recherche de biomarqueurs diagnostiques permettant un diagnostic précoce, à un stade où un traitement curatif est encore possible, notamment dans le domaine de la cancérologie. Dans le domaine de la pathologie hépatobiliaire, nous avons démontré le potentiel de la spectroscopie vibrationnelle appliquée au sérum, dans un premier temps, pour le diagnostic de cirrhose, puis pour l'identification de patients cirrhotiques atteints de carcinome hépatocellulaire..

Nous terminerons par montrer quelques résultats préliminaires sur le développement de sondes Raman fibrées, spécifiquement dédiées aux analyses cutanées in vivo.

Evaluation de la vascularisation tumorale par échographie de contraste : De la modélisation numérique à l'imagerie *in-vivo*

L. Boyer¹, I. Leguerney¹, V. Grand-Perret¹, B. Coiffier¹, B. Benatsou¹, N. Lassau¹, et S. Pitre-Champagnat¹

¹IR4M (UMR8081) CNRS – Univ. Paris Sud – Université Paris Saclay, Département d'Imagerie, Gustave Roussy

Introduction : Aujourd'hui, un des nouveaux enjeux en cancérologie est d'accéder à l'imagerie multiparamétrique de la perfusion tumorale pour évaluer le flux et le volume sanguin mais également son hétérogénéité vasculaire. Ces informations sont en effet capitales lorsqu'il s'agit d'évaluer le bénéfice d'un traitement anti-angiogénique. L'équipe a été précurseur dans ce domaine avec le développement et la validation clinique d'une modélisation mathématique de la prise de contraste en échographie de contraste (DCE-US) permettant ainsi l'évaluation semi-quantitative des paramètres de la vascularisation tumorale. L'imagerie DCE-US reste néanmoins une modalité récente et ne bénéficie pas encore des outils méthodologiques importés de la physique que sont la modélisation numérique et l'étude expérimentale sur fantôme pour aborder la problématique de la quantification par imagerie multiparamétrique. Ce projet de recherche visait donc à développer ces outils pour caractériser la micro-vascularisation tumorale associant la perfusion tumorale (flux et volume sanguin) à la description de son hétérogénéité et à terme, d'étendre cette approche à l'imagerie multimodale en associant la DCE-US à la DCE-IRM et au PET-scan.

Méthodes : Pour évaluer les méthodes de quantifications de la micro-vascularisation tumorale à partir du rehaussement du signal ultrasonore, deux approches ont été explorées :

1. La modélisation numérique de la dynamique des fluides dans un réseau vasculaire La modélisation faite par CFD a permis d'étudier l'influence des variables physiologiques d'une tumeur à savoir son volume vasculaire et son débit sanguin sur le rehaussement du signal ultrasonore. L'écoulement du sang et le transport des agents de contraste ultrasonore dans les vaisseaux tumoraux ont été modélisés selon une approche Euler-Lagrange. Pour approcher les conditions physiologiques réelles d'un réseau vasculaire tumoral, des fantômes numériques ont été développés d'une complexité croissante avec des vitesses d'écoulements du sang et d'agent de contraste extrait des études *in-vivo* menées sur modèles animaux. Les simulations numériques ont été au préalable validées via la confrontation des données avec celles obtenues expérimentalement à partir d'un setup micro-fluidique.
2. l'évaluation *in-vivo* des méthodes de quantification du signal ultrasonore via des expérimentations sur souris. Dans cette étude, la vascularisation des tumeurs a été déterminée par échographie de contraste ultrasonore, mais également par imagerie par résonance magnétique (IRM) de contraste.

Résultats & Conclusion: Les résultats ainsi obtenus ont fait l'objet d'une thèse et seront présentés.

Tomographie par émission de positons et échographie ultrarapide simultanées in vivo

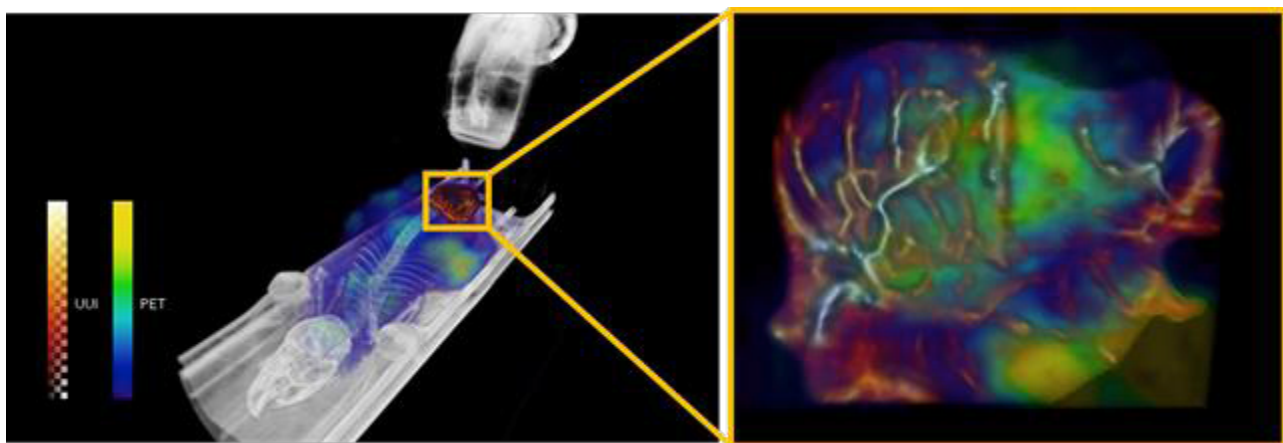
Jean Provost¹, Anikitos garofalakis², Thomas Viel², Damien Bouda²,
Joevin Sourdon², Bertrand Tavitian², Mickael Tanter²

¹Institut Langevin, ESPCI Paris, PSL Research University, CNRS UMR 7587, INSERM U979, ²PARCC INSERM UMR 970, France.

Le développement de nouveaux outils diagnostiques et traitements pour nos plus grands défis en santé comme le cancer pourrait grandement bénéficier d'une compréhension multifactorielle et multi-échelle des phénomènes biologiques sous-jacents. Dans ce travail, nous introduisons une nouvelle modalité d'imagerie permettant la tomographie par émission de positons (TEP) et l'échographie ultrarapide (EU) de façon simultanée. La TEP est la modalité d'imagerie moléculaire la plus sensible et peut donc détecter de subtils changements à l'échelle moléculaire mais ne peut pas imager la structure des tissus et offre des résolutions temporelle et spatiale limitées. L'EU quant à elle peut acquérir des images à des cadences atteignant plus de 10 000 images par seconde avec une résolution de l'ordre de la centaine de microns pour cartographier de façon quantitative la structure et la fonction des tissus comme le débit sanguin. L'objectif de cette étude était de démontrer la faisabilité de l'imagerie PET/EU simultanée dans les rongeurs pour des études précliniques.

L'appareil PET/EU a été construit en utilisant un échographe ultrarapide Aixplorer (Supersonic Imagine, France) et un appareil TEP/CT Nano-PET (Mediso, Hongrie). Une sonde échographie centrée à 15 MHz (Vermon, France) contrôlée par un micro-positionneur à six degrés de liberté motorisé (Physik Instrumente, Allemagne) a été utilisée pour faire de l'imagerie Doppler Ultrarapide en trois dimensions en concaténant plusieurs coupes bidimensionnelles. Spécifiquement, des séquences ultrasonores de 400 ms à 500 images/s et basée sur le compound cohérent de 11 ondes planes ont été utilisées pour chaque coupe. Les acquisitions de TEP étaient basées sur l'injection de fludeoxyglucose-F-18 (FDG) et duraient 15 minutes. L'alignement des deux modalités a été validé par imagerie CT dans un fantôme contenant des fils métalliques et l'effet atténuant de la sonde dans l'appareil PET quantifié à l'aide d'un fantôme NEMA. La séquence TEP/EU a ensuite été utilisée dans des tumeurs sous-cutanées chez la souris.

L'étude sur fantôme a permis de déterminer la précision de l'alignement entre la TEP et l'EU, qui était de 0.95 ± 0.28 mm ($n=10$), ce qui est inférieur aux résolutions des deux modalités. L'effet atténuant de la sonde échographique était inférieur à la variation normale de signal, c'est-à-dire non significatif. Enfin, l'étude sur tumeurs sous-cutanées a montré la faisabilité de l'imagerie TEP/EU en décrivant simultanément la vascularisation des tumeurs et leur métabolisme (voir Figure). Ces résultats initiaux démontrent la faisabilité de l'imagerie TEP/EU et son intérêt pour l'étude du lien entre angiogénèse et métabolisme dans les tumeurs.



Imageries TEP/EU simultanées, superposées à l'imagerie CT (blanc). La vascularisation a été résolue en utilisant l'imagerie Doppler ultrarapide et est fusionnée au métabolisme du glucose quantifié par TEP.

Cartesian versus radial Ultra Short Echo Time (UTE) acquisition schemes for myocardial tissue sodium quantification at 7 Tesla

Stanislas Rapacchi¹, Mark Bydder¹, Maxime Guye¹, Monique Bernard¹, Alexis Jacquier², Frank Kober¹

¹ CRMBM CEMEREM UMR 7339 CNRS Aix Marseille Université

² CRMBM CEMEREM UMR 7339 CNRS Aix Marseille Université AP-HM

Introduction: This study proposes to improve signal-to-noise ratio (SNR) efficiency in sodium (²³Na) MRI for the quantification of tissue sodium concentration in the myocardium at 7 Tesla. Typical strategy for improving ²³Na-MRI relies on ultra-short echo time (UTE) sequences (1,2) to compensate for low sensitivity and rapid signal decay of the signal. However, radial UTE introduces a SNR penalty and imposes constraints on excitation pulses that limit UHF applications, thus Cartesian sampling might become advantageous for sodium MRI.

Methods: Signal-to-noise ratio (SNR) efficiency ($SNRe = SNR/\sqrt{time}$) ratio between a 2D-radial UTE and a 2D-Cartesian acquisition is evaluated theoretically from eq.[1] :

$$\frac{SNRe_{Cart}}{SNRe_{UTE}} = \frac{\left(\lambda_f e^{-\frac{TE_{Cart}}{T2^*f}} + (1 - \lambda_f) e^{-\frac{TE_{Cart}}{T2^*s}} \right) \eta_C}{\left(\lambda_f e^{-\frac{TE_{UTE}}{T2^*f}} + (1 - \lambda_f) e^{-\frac{TE_{UTE}}{T2^*s}} \right) \eta_{UTE}} \quad (1)$$

with the kspace sampling SNR efficiency(3): $\eta = \frac{A}{\int_A^D \int_{AD} \frac{1}{D}}$, where A and D are the kspace coverage and density, respectively.

Simulations from eq.[1] show that the intrinsic k-space construction of ultra-short echo time (UTE) introduces a SNR penalty greater than the bi-exponential T2-decay of the signal such that Cartesian imaging becomes advantageous for a large range of echo times. An aqueous sodium phantom was imaged at 7T for validation of theoretical SNR benefits. Next, Cartesian and UTE sodium MRI were compared in vivo for cardiac imaging at 7T in a sample of 6 healthy volunteers. Finally, a pipeline for tissue sodium concentration was established to compare quantitative findings from Cartesian sodium MRI to the literature.

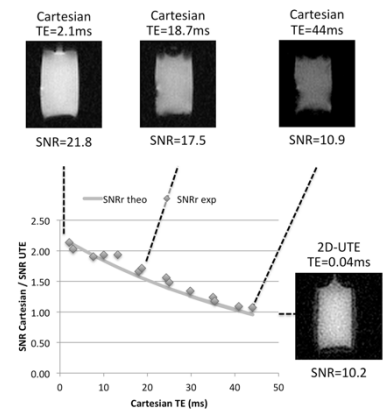


Figure 1: Theoretical and experimental SNR ratio in a phantom bottle. The SNR of the Cartesian image was higher for all echo times below 40ms, with high correlation to eq. (1) ($R=0.98$, $p=0.002$).

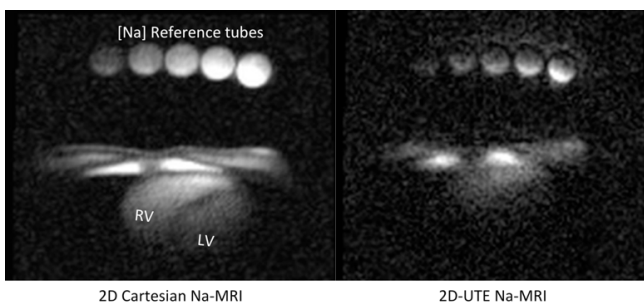


Figure 2: Example of ²³Na-MRI images ($2 \times 2 \times 10 \text{mm}^3$ resolution) with a 2D-Cartesian acquisition (left) and a 2D-UTE acquisition (right). The 2 acquisitions share all parameters except TE (0.04ms for UTE and 2.34ms for Cartesian) and k-space trajectory.

Results: Experimental SNR benefits in the phantom (Figure 1.) had excellent correlation ($R=0.98$, $p=0.002$) with theoretical predictions. In vivo SNR benefits of the Cartesian acquisition, observed in Figure 2, measured in the septum outperformed expected benefits (43% SNR increase compared to 29% expected). The quantification of sodium concentration (Figure 3) gave results that were well within range of reported values for both myocardium: $33.7 \pm 10.1 \mu\text{mol/g}$ ($31-41 \mu\text{mol/g}$ reported(4,5)) and ventricular blood pool: $71.4 \pm 14.4 \mu\text{mol/g}$ ($79 \mu\text{mol/g}$ reported(5)).

Conclusion: The need for SNR optimization of sodium MRI leads to reconsider Cartesian imaging. Cartesian sodium MRI

offers substantial SNR benefits, relaxes constraints on radiofrequency excitations but discards the short T2 component of the sodium signal. Moreover, Cartesian sodium MRI provides reliable quantification of tissue sodium concentration that warrants further clinical investigations.

1. Konstantin S, Nagel AM, Heiler PM, Schad LR. Two-dimensional radial acquisition technique with density adaption in sodium MRI. Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med. 2011;65:1090–1096. doi: 10.1002/mrm.22684.; 2. Resetar A, Hoffmann SH, Graessl A, Winter L, Waiczies H, Ladd ME, Niendorf T, Nagel AM. Retrospectively-gated CINE ²³Na imaging of the heart at 7.0 Tesla using density-adapted 3D projection reconstruction. Magn. Reson. Imaging 2015;33:1091–1097. doi: 10.1016/j.mri.2015.06.012.; 3. Lauzon ML, Rutt BK. Polar sampling in k-space: Reconstruction effects. Magn. Reson. Med. 1998;40:769–782. doi: 10.1002/mrm.1910400519.; 4. Constantinides CD, Kraitchman DL, O'Brien KO, Boada FE, Gillen J, Bottomley PA. Noninvasive quantification of total sodium concentrations in acute reperfused myocardial infarction using ²³Na MRI. Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med. 2001;46:1144–1151.; 5. Ouwerkerk R, Weiss RG, Bottomley PA. Measuring human cardiac tissue sodium concentrations using surface coils, adiabatic excitation, and twisted projection imaging with minimal T2 losses. J. Magn. Reson. Imaging JMIR 2005;21:546–555. doi: 10.1002/jmri.20322.

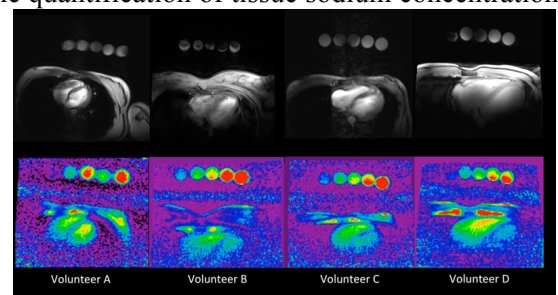


Figure 3: ¹H imaging (top) and ²³Na quantification (bottom) in 4 different volunteers with variable anatomy. The heart was well observed in volunteers A, C and D, whereas the breasts in volunteer B increased the

Contrôle optimal des champs magnétiques radio-fréquence en Imagerie et Spectroscopie par Résonance Magnétique

H. Ratiney¹, E. Van Reeth¹, M. Tesch², S. Gaillard¹, S. Glaser², O. Beuff¹, D. Sugny^{3,4}

¹Université de Lyon, CREATIS, CNRS UMR5220, Inserm U1044, INSA-Lyon, UCBL 1, France ; ²Department of Chemistry, Technische Universität München, Germany; ³ICB, UMR5209 CNRS-Université de Bourgogne, France ; ⁴Institute for Advanced Study, Technische Universität München, Germany

Résumé : La plupart des séquences utilisées en IRM/SRM emploie des séries d'impulsions radio fréquences, dont la stratégie d'application résulte – le plus souvent - d'une manipulation intuitive et empirique de l'aimantation macroscopique. Des travaux récents, théoriques et sur spectromètre haute résolution ont démontré la possibilité de contrôler la dynamique des spins via la théorie du contrôle optimal (CO). Cette théorie fut créée, dans sa version moderne, à la fin des années 50 avec le Principe du Maximum de Pontryagin (PMP) [1]. Elle a montré toute son efficacité en information quantique et en spectroscopie RMN haute résolution [2] mais très peu de résultats ont pour l'instant été obtenus en IRM. Le contrôle optimal en RM va consister à contrôler un système de spins qui est un système dynamique régit par les équations de Bloch - au moyen d'une commande : le champ – radio fréquence (B1)- pour l'amener d'un état initial à un état final donné. Il y a en général une multitude de façon de réaliser cette action et le contrôle optimal permettra de trouver la commande et la dynamique associée qui minimisera ou maximisera un certain critère d'optimisation. Nous présentons les premières applications du contrôle optimal de la saturation sur un imageur petit animal, pour contrôler le contraste en IRM [3] et la suppression de l'eau en spectroscopie *in vivo* (Fig. 1 et 2). Selon le formalisme du PMP, le contraste de saturation peut par exemple être exprimé pour la fonction coût à minimiser: $C(\mathbf{bI}) = \|M_a(\text{tf})\|^2 - \|M_b(\text{tf})\|^2$ où $\mathbf{bI} = (b1x, b1y)$ est le champ RF à optimiser. La trajectoire optimale du vecteur aimantation (\mathbf{M}) et de son vecteur adjoint (\mathbf{p}) doivent satisfaire les équations de Hamilton

$$\dot{\mathbf{M}} = \frac{\partial H}{\partial \mathbf{p}}; \dot{\mathbf{p}} = -\frac{\partial H}{\partial \mathbf{M}}$$

avec les conditions aux limites suivantes : $M(a,b)(t_0) = (0,0,M_0(a,b))$; $P(a,b)(\text{tf}) = -dC/dM(a,b)(\text{tf})$. Ces équations sont résolues en utilisant la méthode GRAPE [4], qui est fondée sur une descente de gradient.

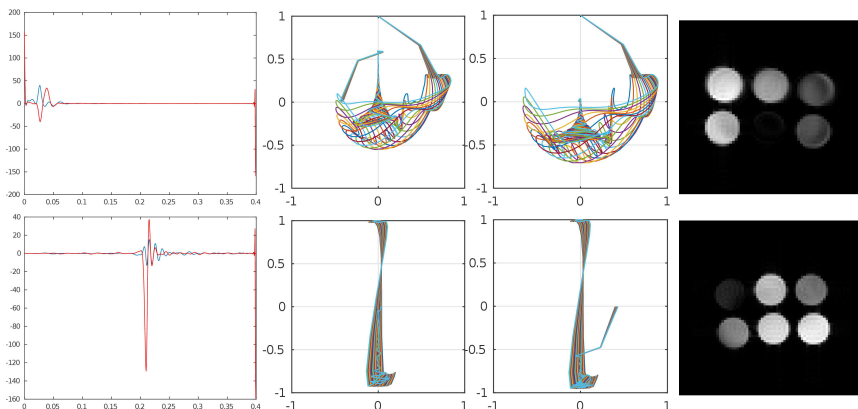


Fig 1 : haut: Maximise échantillon1 (ech1 haut gauche) et sature le 5^{ème} (milieu bas) ; Bas : Sature le 1er et maximise le 5^{ème}. De gauche à droite: Champ B1 optimal (partie réelle et imaginaire), propagation pour ech1 dans la sphère de Bloch (z,x), puis pour ech 5, enfin résultats expérimentaux sur IRM 4.7T avec prise en compte des inhomogénéités B0 [-80,80]Hz

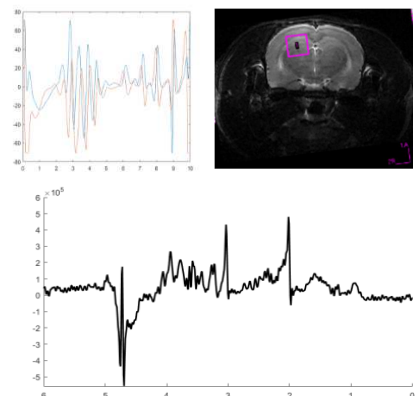


Fig2 : Haut : Champ RF-B1- (partie réelle et imaginaire) obtenu par CO, réalisant en 10ms la suppression d'eau. Bas: spectre acquis sur cerveau de rat à 4.7T utilisant ce pulse RF en amont d'une séquence PRESS.

Ces travaux démontrent la faisabilité sur un imageur préclinique et *in vivo* d'une génération de champ RF par CO en adéquation avec la théorie et résultats obtenus en SRM haute résolution [2]. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de séquences IRM.

Remerciements : Les acquisitions ont été réalisées sur la plateforme PILOT. Ce travail a pu se réaliser grâce au financement ANR- DFG du projet de recherche Explosys (Grant No. ANR-14-CE35-0013-01; GL203/9-1) et dans le cadre du LABEX PRIMES (ANR- 11-LABX-0063/ ANR-11-IDEX-0007).

Références : [1] Mathematical theory of optimal processes L. Pontryagin et al., Mir Moscou (1974); [2] Optimal control methods in NMR spectroscopy N. C. Nielsen, et al. Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, (2010); [3] Optimizing MRI contrast with B1 pulses using optimal control theory, E Van Reeth, et al. ISBI, (2016); [4] Optimal control of coupled spin dynamics: design of nmr pulse sequences by gradient ascent algorithms, N. Khaneja et al., Journal of Magnetic Resonance, (2005)

Increasing specificity of contrast-enhanced ultrasound imaging using the interaction of quasi counter-propagating wavefronts: a proof of concept.

G. Renaud^{1,2}, J. G. Bosch¹, A. F. W. van der Steen^{1,3} and N. de Jong^{1,3}

¹Biomedical Engineering, ThoraxCenter, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands ²Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, UPMC – CNRS UMR 7371 – INSERM UMR S 1146, Paris, France ³Acoustical Wavefield Imaging Research Group, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands

Résumé : Detection methods implemented in present clinical ultrasound scanners for contrast-enhanced ultrasound imaging show high sensitivity but a rather poor specificity due to pseudo-enhancement (false detection of contrast agent) produced by nonlinear wave propagation. They all require linear ultrasound propagation in order to detect nonlinear scattering of contrast agent microbubbles. Even at low transmit pressure, nonlinear wave propagation occurs in regions perfused with contrast agent because contrast agent microbubbles can dramatically enhance the nonlinear elastic behavior of the medium. This image artifact hinders further development of contrast-enhanced ultrasound imaging towards reliable quantitative measurement of local concentration of contrast agent and blood perfusion kinetics. We propose a new detection method that produces contrast images with highly reduced pseudo-enhancement. It is based on the interaction of two diverging wavefronts broadcasted by two single elements of a conventional probe array. The contrast image is formed line by line, one single image line is the line segment bisector defined by the centers of the two transmitting elements. Each image line is formed by a three-step pulse sequence: 1) transmission with one element, 2) transmission with the other element and 3) transmission with both elements. The proof of principle is shown with numerical simulations and in vitro experiments. The method is implemented in a programmable ultrasound system and tested in a tissue mimicking phantom containing a vessel filled with diluted contrast agent. At a given depth, increasing the distance between the two transmitting elements increases the angle describing the propagation directions of the two wavefronts. As a result the nonlinear interaction between the two broadcasted waves is reduced. We show experimentally that increasing the distance between the transmitting elements from 0.6 mm to 24 mm reduces the amplitude of the pseudo-enhancement at the far wall of the vessel relative to true contrast signal amplitude in the vessel by 12 dB, therefore improving specificity in the contrast-enhanced image.

T1 Longitudinal quantification of iron-oxide particles using a 3D UTE Look-Locker sequence at 7T
EJ Ribot¹, CR Castets¹, M Adhikari-Paudel¹, N Koonjoo¹, S Miraux¹

¹*Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS/ Université de Bordeaux,*

Purpose: Iron-oxide particles (IOP) are often used for angiography and cell tracking. Analyzing and quantifying the T2 and T2* shortening induced by these particles is difficult in vivo, especially at high magnetic fields, mainly because of field inhomogeneities and motion artifacts. Nevertheless, correct quantification of iron particles is essential to evaluate non-invasively particle-clearance or to determine the amount of therapeutic cells reaching a tumor. Thus, the goal of our project was to quantify the concentration of iron-oxide particles based on longitudinal relaxation times T1 parametric mapping on small animals at high magnetic field. However, this quantification encounters numerous issues : the high T2 and T2* effects of the nanoparticles, the long longitudinal relaxation times compared to transversal ones, and the long acquisition time for high spatial resolution 3D image acquisition.

To circumvent these problems, a 3D T1-mapping sequence with an ultra-short echo time (UTE) and spiral encoding was developed [1]. A look-locker (LL) module was also included to decrease the sensitivity to motion and to fasten acquisition time of 3D images. The sequence was compared in vitro to a standard Inversion-Recovery (IR) technique in terms of accuracy and preliminary results were obtained on mice.

Materials and Methods: A 3D stack-of-spiral sequence was developed. The slice selection gradient was removed in order to achieve a UTE of 0.5ms and a LL module was inserted. Two spiral interleaves were acquired at each Inversion Time (TI) in order to further reduce acquisition time. The other sequence parameters were: FOV=20x20x16; matrix=128x128x64; 20 interleaves per stack; 64 stacks; 50 points separated by 10, 30 and 80 ms (resulting in 5min, 10min and 23min acquisition times). Imaging was performed using a 7T small-animal scanner (Bruker). Longitudinal relaxivities (r_1) were measured on tubes containing increasing concentrations (0; 0.125; 0.25; 0.5; 1 and 2.5mM) of Sinerem (Guerbet, France), Ferumoxytol and P904 (Chematech) diluted in saline. The relaxivities were also measured using a standard Inversion-Recovery sequence (TR=10s; 400 points separated by 10ms; 1 slide of 2mm thickness; acquisition time= 12h). Then, C57/Bl6 mice were intravenously injected with 100 μ mol/kg of Ferumoxytol or P904 and scanned right after the injection, 1h, 2h, 4h, 6h and 24h post-injection. T1 parametric maps were reconstructed using a home-made fit.

Results: Using the combination Spiral+UTE+LL, all the tubes containing increasing concentrations of IOP were detected with hyper-intense signals. The in vitro results demonstrated that the newly developed sequence enabled to measure accurately T1 values of a concentration range adapted to in vivo experiments. Indeed, the T1 values were similar to the ones measured using an IR sequence (T1 values were less than 5% different).

In vivo data demonstrated that the T1 of Ferumoxytol or P904 within the jugular veins could be measured using our 3D sequence. Immediately after injection, T1 values decreased by 80%. The half-life of Ferumoxytol and P904 were measured to be 4h50min and 118min, respectively.

Discussion: The new sequence developed in this project enabled to measure accurately T1 of iron-oxide particles in vitro. The adjustments of the delay between each TI allowed correct measurements of a wide range of IOP concentrations. Encouraging results were obtained in vivo. Further experiments will be performed by injecting different doses of IOP and the clearance of different contrast agents will be evaluated.

Conclusion: This research work would be very useful to determine the clearance of compounds non-invasively without the need of blood samples. Furthermore, this sequence would be of great interest for cell therapies when evaluating the amount of therapeutic cells locally.

References: [1] Castets CR et al. NMR Biomed. 2015; 28: 881–889

In vivo 3D T1 mapping allows to differentiate glioma and brain metastases Mn(II) efflux in mice

EJ Ribot¹, CR Castets¹, N Koonjoo¹, S Miraux¹

¹*Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS/ Université de Bordeaux,*

Purpose: Metastases reduce drastically the survival rate of cancer-treated patients. MRI is a method of choice to detect them, due to its non-invasiveness that allows longitudinal studies. To obtain functional information, Gd-based contrast agents are usually injected to identify leaky tumor vasculature. However, accurate quantitative information on T1 modification can't be usually obtained due to the fast clearance of the contrast agent. Also, these vascular contrast agents limit data interpretation only to the extracellular space. MEMRI (Manganese Enhanced MRI) seems to be an interesting method to obtain precise contrast agent concentration within tumors as Mn(II) ions enter the cells through calcium channels. This feature would allow to give information about tumor cell activities. Thus, the goal of this study was to quantify longitudinally and with high-spatial resolution Mn(II) uptake in brain tumors and brain metastases by measuring T1 values with a 3D spiral Look-Locker method.

Methods: U87-MG human glioma cells were injected intracerebrally into nude mice whereas MDA-MB-231Br cells were injected in the systemic circulation through an intracardiac injection. When tumors were detected on T2-weighted MR images, MnCl₂ (50mM; 60μL in NaCl) was slowly injected intravenously. Mice were scanned immediately, 1h, 4h, 19h, 3 days and 1 week after the MnCl₂ injection on a 7T small-animal scanner (Bruker). The T1 was measured using a 3D spiral Look-Locker sequence: FOV=20x20x14mm; matrix=128x128x64; spatial resolution: 156x156x218μm; 12 interleaves per stack; 64 stacks; 23 TI with 140ms/Ti; TR/TE=6.4/1.13ms; FA: 10°; acquisition time=21min. The T1 parametric images were reconstructed using a home-made fit.

Results: After injection, the primary tumors and the metastases with leaky vasculature took up the manganese(II) ions. Right after the injection, Mn(II) ions were homogeneously trapped within tumor cells, generating hypersignals on T1-weighted MR images. T1 was quantified in each voxel within the tumors and the metastases.

Right after the Mn(II) injection, the T1 of the brain metastases shortened drastically. Two populations were observed: one which T1 decreased by ≈25% and the other which T1 decreased by ≈60%. For each population, the T1 values returned to its the pre-injected values 24h post Mn(II) ions injection.

As opposed to metastases, the mean T1 values within the glioma decreased by ≈40%. This T1 value remained stable for at least 1 week.

In vitro experiments demonstrated a similar trend in the Mn(II) retention time as in vivo for both cell lines. Incubations with Verapamil, an inhibitor of the Calcium-Sensing Receptor (CaSR), enabled to retain Mn ions into the glioma cells, decreasing T1 by ≈50% after 4 hours of incubation as compared to Verapamil-untreated cells. The effect of Verapamil onto the metastatic cells was wider, inducing Mn(II) ions retention by 10% to 50%.

Furthermore, the inhibition of TRP calcium channels using SKF-96365, enabled to drastically decrease Mn(II) ion uptake for both cell lines.

Discussion: Due to the leaky vasculature, Mn(II) ions accumulated massively within the tumors and metastases right after the injection. The uptake of Mn(II) ions uses calcium pathways, especially TRP channels. However, there was a difference between the clearances of Mn(II) ions from the primary tumors and the metastases. These results might be explained by the activity of CaSR that induces a faster efflux of Mn(II) ions from the metastases.

Conclusion: Quantifying Mn(II) ions uptake within tumors might be a biomarker of chemo-resistance of tumors and metastases.

References: [1] Braun RD et al. PLOS One. 2012;7(2):e30572 [2] Castets CR et al. NMR Biomed. 2015;28:881–889

In vivo mapping of protease activity using Overhauser-enhanced MRI: challenges and promises

Neha Koonjoo¹, Philippe Massot¹, Philippe Mellet¹, Jean-Michel Franconi¹, Paul Brémond², Gérard Audran², Sylvain Marque², Elodie Parzy¹ & Eric Thiaudière¹

¹ *Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536 CNRS-Université de Bordeaux.* ² *Institut de Chimie Radicalaire, UMR 7273 CNRS-Aix Marseille Université*

The recent developments of imaging techniques provides opportunities to increase the ability to visualize in vivo biological processes in intact organisms.

Among atraumatic molecular imaging strategies, OMRI/PEDRI has shown its potential to underline and target specific activities such as pH linked activities and tissue redox processes (1-2). The principle is to prompt through a double resonance experiment the polarization transfer from an unpaired electron of a free radical to surrounding water protons.

This method has been used at 0.2 T to locate in vivo proteolysis in mice. For this purpose an EPR cavity operating at 5.43 GHz was inserted in an open MRI system (8.24 MHz NMR frequency). Pulsed EPR-MRI sequences including a keyhole fully balanced steady-state free precession sequence was used to generate 3D images within only 20 seconds and with a spatial resolution of 500 μ m in each direction.

In a first step proteolysis was detected with a nitroxide-labeled elastin (3). In the absence of proteolysis the rotational correlation time of this macromolecule was too high to generate narrow EPR lines, thus preventing efficient DNP. After digestion into rapidly tumbling fragments the decrease in correlation time was suitable for OMRI detection. Normal intestinal digestion of the the nitroxide-labeled elastin was thus revealed after oral gavage, with signal enhancements of around 7.

In a next step, our collaborators synthesized a beta-phosphorylated nitroxide substrate. This molecule was exhibiting a acetyl to ketone conversion upon enzymatic hydrolysis leading to a variation of the phosphorus hyperfine coupling constant of around 4 G. The presence of either the substrate or the product was assessed by tuning the EPR cavity to the desired frequency. During in vivo OMRI experiment after gavage of living mice with this probe, the signal enhancement was first detected in the stomach when the EPR cavity was tuned at 5.4257 GHz (substrate) and disappeared over time. Conversely signal enhancement increased at 5.4175 GHz EPR frequency (product) upon hydrolysis by stomach enzymes.

These studies highlight the great potential of our OMRI approach in the field of Molecular Imaging in detecting proteolytic activity. Combined with a specific molecular probe, this tool is efficient and robust. It can be used to target more specific enzymes to evaluate unregulated proteolytic activities in various models of experimental diseases and for drug testing.

References

(1) Krishna MC, English S, Yamada K, Yoo J, Murugesan R, Devasahayam N, Cook JA, Golman K, Ardenkjaer-Larsen JH, Subramanian S, Mitchell JB. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99(4): 2216–2221 (2002). (2) Takahashi, Wataru, Andrey A Bobko, Ilirian Dhimitruka, Hiroshi Hirata, Jay L Zweier, Alexandre Samouilov, and Valery V Khramtsov . “Proton-Electron Double- Resonance Imaging of pH Using Phosphonated Trityl Probe”. In: *Applied Magnetic Resonance* 45.9, pp. 817–826 (2014). (3) Parzy, Elodie, Véronique Bouchaud, Philippe Massot, Pierre Voisin, Neha Koonjoo, Damien Moncelet, Jean-Michel Franconi, Eric Thiaudière, and Philippe Mellet . “Overhauser-enhanced MRI of elastase activity from in vitro human neutrophil degranulation”. In: *PLoS ONE* 8.2, e57946 (2013),

Acknowledgements : this work received the financial support from the French National Agency (ANR) in the framework of the Investments for the Future, within the TRAIL Cluster of Excellence (ANR-10-LABX-57)

Real-time Magnetic Resonance (MR) Thermometry for cardiac radiofrequency ablation monitoring: a direct visualization of lesion formation.

Solemn Toupin^{1,2}, Pierre Bour^{1,3}, Valéry Ozenne¹, Matthieu Lepetit-Coiffé², Baudouin Denis de Senneville⁴, Rainer Schneider⁵, Arnaud Chaumeil¹, Pierre Jais¹ and Bruno Quesson¹

¹L'Institut de Rythmologie et modélisation cardiaque (LIRYC) – U1045, Pessac, France. ²Siemens Healthcare France, Saint-Denis, France. ³Image Guided Therapy (IGT), Pessac, France. ⁴Institut de Mathématiques de Bordeaux (IMB), Bordeaux, France. ⁵Siemens Healthcare, Erlangen, Germany

Introduction: Catheter-based radiofrequency ablation (RFA) has become a reference curative therapy for the treatment of cardiac arrhythmias. Magnetic Resonance (MR) Thermometry has the potential to provide real-time visualization of temperature distribution in the myocardium during RFA to improve safety and assessment of the therapy outcome. In this study, we investigated the feasibility of a full automated MR Thermometry method operating on a 1.5T scanner. This approach was evaluated on the left ventricle (LV) in five healthy volunteers without heating and in vivo in a large animal model during RFA, with a spatial resolution of 1.6x1.6x3 mm³ and 3 to 5 temperature slices acquired at each cardiac cycle.

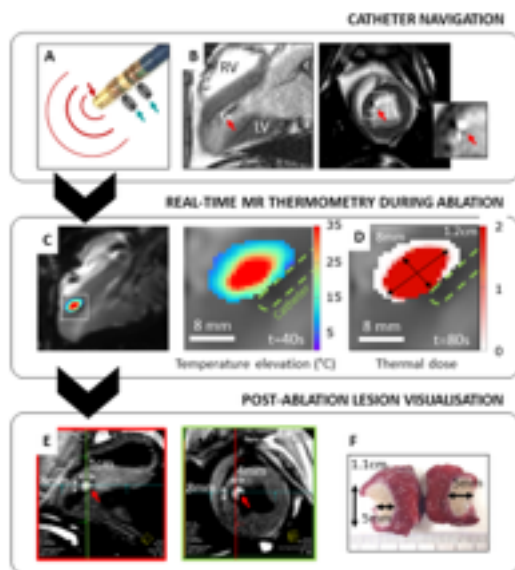


Figure 1: MR-guided radiofrequency ablation procedure pipeline. A MR-compatible catheter (A) is located into the left ventricle (LV) of a sheep. Micro-coils equipped on the catheter (A, blue arrows) are visible as white spot on MR images (B). A radiofrequency ablation is then run at the tip of the catheter (A, red arrow) at 70W for 40s. Temperature in target tissues is measured in real-time using a multi-slices MR thermometry sequence at a spatial resolution of 0.8x0.8x3 mm. Post-ablation, a 3D sequence allow ablation visualization without contrast agent (E). Lesion size is correlated between cumulated thermal dose map (D), 3D images and gross pathology (F).

Methods: An Echo Planar Imaging (EPI) sequence was combined with parallel imaging to achieve a 1.6x1.6x3 mm spatial resolution. Zero filling was performed on raw data to obtain a voxel size of 0.8x0.8x3 mm. Three to five slices were continuously acquired at each RR-cycle with ECG triggering. A navigator was located on the diaphragm to adjust the slice position in real-time and compensate through-plane respiratory motion. Residual in-plane motion and associated susceptibility phase changes were compensated online [1,2]. A MR-compatible catheter was located into the sheep LV under fluoroscopy guidance. Real-time MR guidance of the catheter was then performed using a real-time interactive bSSFP sequence. Scanning slices were automatically adjust on catheter tip based on active markers position (A). After the ablation, a 3D inversion recovery sequence was performed to visualize the lesion without contrast agent.

Results: On each volunteer and on the sheep, a temperature precision below 2°C on LV was achieved. Ablation catheter was successfully located in real-time with the micro-coils visible on images (B). Irrigated RFA (70W for 40s) was performed in the sheep with simultaneous MR thermometry. Quantitative temperature elevation (C) up to 45°C was observed on 4 slices around the catheter tip. Thermal dose mapping (D) was consistent with lesion dimensions observed on 3D IR sequence (E) and with gross dissection (F).

Conclusions: This study demonstrated the feasibility of monitoring temperature and ablation extent within the targeted tissue. This could be a major step in the improvement of safety and efficacy of catheter ablation for the treatment of cardiac arrhythmia.

References: [1] B. D. de Senneville et al. NMR Biomed., 2012 [2] Ozenne et al. MRM, 2016

USPIO enhanced Self-Gated 4D FLOW imaging of the mouse cardiovascular system at 7T with an ultrashort Echo Time sequence

AJ Trotier¹, CR Castets¹, W Lefrançois¹, S Miraux¹

¹ *Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536 CNRS-Université de Bordeaux, France.*

Background

4D flow MRI at the cardiac level on mouse models remains very difficult due to the very small size of vessels and the extremely high cardiac rhythm. Furthermore, the saturation of the spin into the heart leads to a lack of signal which limits the study of abnormal blood flow in the heart or in the descending aorta. To overcome these problems we proposed to use a new 4D FLOW-UTE (Ultra-short Echo Time) sequence synchronized to the heartbeat without ECG. This sequence was used in combination with an injection of Ultra Small Particles of Iron Oxide (USPIO) to obtain a positive signal in blood. Effect of undersampling on image quality and flow measurements was quantified to limit the total acquisition time.

Methods

A 3D ultrashort echo time (UTE) sequence with a navigator signal and bipolar encoding gradients was performed at 7T on healthy mice (n=8) injected with ultrasmall super paramagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. 30000 spokes were acquired with a pseudo-random distribution and acquisition was repeated with a number of repetitions (NR) of 20. 20 magnitude and flow frame images at 156 μm resolution were reconstructed retrospectively with NR = 20 / 12 / 6 and 3 and compared in term of signal-to-noise ratio (SNR), contrast-to-noise ratio (CNR) and flow velocity in the aortic arch. To visualize blood flow streamline, flow data were segmented with the PC-MRI data and then exported from Matlab into an open source software Paraview (Kitware, Clifton, NY). Four hundred streamlines were emitted backward and forward from the mid-ascending aorta. Four target plans were positioned downstream of the emitter plane and number of streamline going through these planes were counted for dataset reconstructed with NR = 20, 12, 6 and 3.

Results

The combination of 4D FLOW UTE and USPIO injection allowed to obtain a high blood SNR > 30 whatever the NR used during the reconstruction and thus, increased the velocity-to-noise ratio (VNR) on flow images. With NR = 3 datasets, the count of streamline became significantly different at the third and fourth plan from the numbers obtained with the dataset NR = 20. But, no significative difference were observed for dataset NR = 6 and datasets NR = 12 and 20 on the flow rates measurements or streamline lengths.

Conclusions

Combining the injection of iron nanoparticles with a self-gated 4D FLOW-UTE sequence generates a strong signal and positive contrast between blood and surrounding tissues. These properties were exploited to produce images and quantify blood flow velocity of the cardiovascular system in small animals at high magnetic fields with a high spatial < (200 μm)³ and 20 time frames along the cardiac cycle. Total acquisition time could be reduced to 12 minutes 30 s by limiting the number of repetitions. This approach might be useful to quantify blood flow velocities in the whole cardio-vascular system of normal and pathological mouse models.

Evaluation par IRM *in vivo* de la maladie hépatosplénique dans la schistosomiase murineB. Masi¹, T-A. Perles-Barbacaru², C. Laprie³, H. Dessein¹, M. Bernard², A. Dessein¹ et A. Viola²*IINSERM U906, GIMP, Aix-Marseille Université, Marseille, 2CRMBM UMR CNRS 7339, Aix-Marseille Université, Marseille, 3VET-HISTO, Marseille.*

Introduction : La schistosomiase, une maladie tropicale chronique, affecte plus de 240 millions de personnes. Causée par des trématodes du genre *Schistosoma*, elle est associée à une morbidité sévère résultant de la migration des schistosomes dans le foie et du développement d'une fibrose hépatique responsable de la formation de varices et d'une hypertension portale potentiellement mortelle. La gravité de la maladie est souvent difficile à estimer, des marqueurs non-invasifs d'évolution sont donc nécessaires pour le suivi de cette pathologie. Dans cette étude, nous avons caractérisé par IRM *in vivo* la maladie hépatosplénique chez un modèle murin de la maladie et évalué le temps de relaxation T2 comme possible marqueur de fibrose.

Matériels et Méthodes : 12 souris CBA/J contrôles et 12 souris CBA/J infestées par 30 cercaires de *Schistosoma mansoni* ont été imagées sous anesthésie (isoflurane) dans un spectromètre vertical (Bruker AVANCE 500 WB) opérant à 11,75T. Six souris contrôles et 6 infestées ont été examinées 2 et 6 semaines après infestation (groupe 1), 6 autres contrôles et 6 autres infestées à 10 semaines (groupe 2). Des images transversales (champ de vue : 24°;24 mm² ; épaisseur de coupe : 0,5 mm) ont été acquises avec synchronisation respiratoire. Une carte T2 (TR ≥ 9 s; 12 échos également espacés de TE = 7,5 à 120 ms ; matrice : 64x64, 2 accumulations) correspondant à une coupe située à 0,5 mm caudalement de la bifurcation de la veine porte a été acquise. Des images anatomiques (écho de spin 2D ; TR ≥ 448 ms; TE = 14 ms ; matrice : 240°;240 ; 4 accumulations) ont été acquises 15 min après injection ip de 50 µl de DOTAREM® 0,5 M. Le diamètre de la veine porte a été mesuré à 0,5 mm caudalement de la bifurcation afin d'évaluer l'hypertension portale. En fin de protocole (semaine 6/groupe 1, semaine 10/groupe 2), les foies ont été prélevés pour histologie. Les coupes colorées à l'hématoxyline/éosine ont servi à la recherche d'oeufs, de granulomes, de nécrose, et d'infiltrats inflammatoires au niveau portal. Le rouge Sirius a permis la visualisation des fibres de collagène et l'estimation du pourcentage de fibrose. Le test de Mann-Whitney a été employé dans les études volumétriques et le test de Spearman pour analyser la corrélation entre T2 et pourcentage histologique de fibrose (significativité : P<0,05).

Résultats: une hépatomégalie, une splénomégalie et une augmentation du diamètre de la veine porte étaient les premiers signes de la maladie détectables à l'IRM, tous significatifs dès 6 semaines. Des hyperintensités multifocales du foie sont apparues plus tard à l'IRM chez 4 souris 10 semaines après infestation. Ces lésions présentaient un T2 >16 ms alors que le parenchyme hépatique avait un T2 <14 ms. Ces lésions correspondraient histologiquement aux granulomes, à la nécrose hépatocellulaire, aux infiltrats inflammatoires, et à la fibrose. La fibrose était indétectable au rouge Sirius à 6 semaines, tandis qu'à 10 semaines des régions riches en collagène étaient décelées dans les foies infectés. Une corrélation a été établie entre la fraction de T2 comprise entre 16 et 26 ms et le pourcentage de fibrose obtenu en histologie.

Discussion: Nos résultats sont en accord avec les caractéristiques connues de la maladie humaine (organomégalie, hypertension portale et fibrose).¹ Des altérations de la structure hépatique évocatrices d'une fibrose apparue tardivement au cours du suivi étaient détectables en IRM et histologie. Ces lésions formaient des tâches sur les cartes T2 caractérisées par des valeurs de T2 augmentées de 14%. Bien qu'une étude *ex vivo* à 11,75T ait décrit une diminution du T2 dans un modèle murin de fibrose hépatique,² une autre étude *in vivo* à 7T a rapporté une augmentation du T2 comprise entre 17 et 22%. Cette élévation du T2 pourrait découler de l'inflammation et d'un oedème tissulaire. Bien que le nombre d'animaux dans notre étude soit limité, l'augmentation du T2 apparait significativement corrélée au pourcentage histologique de fibrose. Ce résultat suggère que la cartographie du T2 serait un marqueur non invasif fiable de la maladie, susceptible de détecter la fibrose hépatique avec une sensibilité similaire à celle de l'histologie.

Références :

- [1] World Health Organization record: Schistosomiasis. Geneva, Switzerland; 2013.
- [2] Anderson SW et al. J Magn Reson Imaging. 2012;35(1):140-6.
- [3] Chow AM et al. J Magn Reson Imaging. 2012;36(1):152-8

Imagerie du tenseur de diffusion dans la malaria cérébrale murine

T-A. Perles-Barbacaru¹, B. de Brito Robalo¹, E. Pecchi¹, G. E. Grau², M. Bernard¹ et A. Viola¹.

¹Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale, UMR CNRS 7339, Aix-Marseille Université, Marseille, France, ²Department of Pathology, Sydney Medical School, The University of Sydney, Camperdown, Australia.

Introduction : la malaria cérébrale est responsable d'un million de décès par an. Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace, une meilleure compréhension de sa pathogénèse est indispensable pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. La malaria cérébrale expérimentale obtenue avec *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) permet l'étude des mécanismes pathogéniques de la maladie. Nous avons précédemment démontré le rôle central de l'œdème ischémique dans la mortalité associée à ce syndrome cérébral¹⁻³, et recherchons à présent des marqueurs précoces de la maladie. Dans cette étude, nous avons mis à profit l'IRM par tenseur de diffusion (DTI) afin d'étudier la formation de lésions microstructurales.

Matériels et Méthodes : des souris CBA/J (n=8) et C57BL/6J (n=7) ont été infestées avec 2×10^6 érythrocytes parasités (j0). La parasitémie a été estimée à j3 et j5 et l'état clinique suivi quotidiennement. Les souris ont été imagées sous anesthésie gazeuse (isoflurane à 1-2%) dans un spectromètre vertical (Bruker AVANCE 500 WB) opérant à 11,75T. La température (maintenue à 37°C) et la respiration étaient suivies pendant l'examen IRM au moyen de capteurs. Le protocole incluait une IRM axiale T₂ (séquence RARE, facteur RARE=8, TR = 5000 ms, TE eff. = 36 ms, NA = 4, matrice = 194x194, champ de vue = 15x15 mm², 31 coupes de 0,5 mm). Une séquence DTI 2D (12 directions, durée du gradient de diffusion $\delta = 1,65$ ms, temps de séparation du gradient de diffusion $\Delta = 10$ ms, 2 valeurs de b : 0 et 1200 s/mm²) a été utilisée avec une technique d'EPI segmentée (TE = 15,7 ms, 12 segments entrelacés, NA = 4, matrice = 100x100). La séquence DTI était synchronisée avec la respiration (TR ≥ 500 ms). Cinq coupes axiales non contiguës ont été acquises. Les images DTI ont été traitées avec ParaVision 5.1 afin de générer les cartes S0, FA, ADC, λ_1 , λ_2 et λ_3 qui ont été analysées avec ImageJ. Des ROI ont été positionnés dans différentes régions cérébrales. Une analyse statistique non paramétrique a été utilisée (significativité : P<0.05).

Résultats : La présentation clinique de la maladie était similaire dans les deux souches de souris, les signes neurologiques apparaissant vers j5, et étaient suivis d'un coma, puis de la mort entre j6 et J8. Un écrasement des nerfs crâniens, des lésions focales de la substance blanche ainsi qu'un œdème cérébral ont été observés¹⁻³. Les paramètres DTI n'étaient pas différents entre les deux souches avant la maladie. Après infestation, les cartes de FA montraient une diminution progressive de l'anisotropie dans les bulbes olfactifs et la capsule externe. La diminution de la FA était significative avant que les signes neurologiques de la maladie ne soient détectables. La diffusivité axiale (λ_1) n'était pas altérée alors que la diffusivité radiale (λ_2 and λ_3) et l'ADC étaient significativement augmentés au pic de la maladie (j6).

Discussion : la diminution de la FA pourrait indiquer une altération de la microstructure tissulaire. En effet, la diminution de l'anisotropie dans la substance blanche est souvent décrite dans des pathologies de la myéline et de l'axone comme la sclérose en plaques et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. L'augmentation de la diffusivité radiale (λ_2 and λ_3) en l'absence d'altération de la diffusivité axiale (λ_1) suggère une atteinte de la myéline sans atteinte axonale⁴. L'augmentation de l'ADC pourrait également refléter un dommage de la myéline avec perte cellulaire. Des études histologiques sont nécessaires pour comprendre le mécanisme de formation de ces lésions. La diminution de la FA apparaît donc comme un marqueur tissulaire précoce de la malaria cérébrale expérimentale.

Références : 1. Penet MF et al. J Neurosci. 2005; 25: 7352-7358. 2. Penet M-F et al. J Biol Chem. 2007; 282: 14505-14514. 3. Saggi R et al. Am J Pathol. 2011; 179:1104-9 (2011). 4-Song SK et al. NeuroImage. 2002; 17:1429-36.

Thématique

« Bioingénierie »

Champs électriques et cellules souches

F. M Andre¹, L. Lesueur¹, H. Hanna¹, A. Azan¹, T. Garcia-Sanchez¹, L. M. Mir¹

¹*Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, CNRS, Univ. Paris-Sud, Gustave Roussy PR2, 114 rue Edouard Vaillant, Université Paris-Saclay, 94 805 Villejuif, France*

Résumé: Notre équipe s'intéresse aux diverses applications des champs électriques dans le domaine des cellules souches.

Des impulsions électriques peuvent par exemple servir à perméabiliser les membranes plasmiques des cellules (électroporation) permettant alors l'entrée de certaines substances d'intérêt, comme des transgènes (electrotransfert de gènes). Notre équipe a ainsi mis au point un protocole d'électrotransfert de gènes dans les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMs) très efficace permettant de transférer 90% des cellules avec une relativement faible toxicité (70% de survie).

Nous avons ensuite montré que la durée de l'électro-perméabilisation de la membrane plasmique des CSMs est proportionnelle à la taille du plasmide présent lors de l'électrotransfert. Nous avons aussi démontré que si ces cellules sont remises dans leur milieu de culture avant la fin de l'électro-perméabilisation il y a alors un afflux massif de calcium dans leur cytoplasme entraînant leur mort. En présence de gros plasmides il faut attendre au moins 30 minutes après l'électroporation pour que toutes les CSMs soient refermées et survivent dans un milieu de culture contenant du calcium. Nous avons ainsi pu mettre au point un protocole non viral de génération de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS) par électrotransfert de larges plasmides contenant des gènes de reprogrammation dans des CSMs humaines.

Le protocole d'électrotransfert développé pour les CSMs s'est révélé être également efficace pour les fibroblastes et les iPS. Ce protocole est donc maintenant utilisé pour modifier le génome d'iPS par électrotransfert du gène de la CRISPR-Cas9.

Les impulsions électriques peuvent également permettre de contrôler le calcium présent dans les cellules. Ainsi nous avons montré que des impulsions électriques peuvent être utilisées pour contrôler finement les oscillations spontanées du calcium cytosolique observées dans les CSMs. Une impulsion électrique de faible ou moyenne amplitude permet de générer instantanément et de manière répétable un pic calcique dans le cytosol des CSMs totalement similaire aux pics calciques naturels. A l'inverse, une impulsion électrique de forte amplitude induit un pic calcique de plus forte amplitude dans le cytosol et permet d'inhiber, de manière réversible, les oscillations spontanées du calcium cytosolique dans les CSMs et ce pendant plusieurs minutes.

Par conséquent, nous avons montré qu'il est possible de contrôler la fréquence et l'amplitude des oscillations du calcium cytosolique dans les CSMs par des impulsions électriques tout en préservant la viabilité cellulaire. Le contrôle des oscillations du calcium cytosolique pourrait représenter un outil prometteur pour contrôler la différenciation des CSMs. En effet il a été démontré, dans les CSMs, que les oscillations du calcium cytosolique changent en fonction du type cellulaire en lequel les CSMs se différencient. Nous avons également observé des vagues calciques spécifiques aux colonies iPS qu'il pourrait être intéressant de manipuler par des impulsions électriques.

Enfin, notre équipe a récemment démarré la caractérisation des cellules souches (CSMs et iPS) et de leur différenciation par des méthodes biophysique : Microscopie Raman et BioImpédance.

Live super-resolution imaging method meets High Content Screening approach

A. BEGHIN^{1,2}, A. Kechkar^{1,2}, C. Butler^{1,2,3}, D. Choquet^{1,2} and J-B. Sibarita^{1,2}

¹University of Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France ; ²CNRS, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France; ³Imagine Optic, 18 rue Charles de Gaulle, 91400 Orsay, France

Summary: Optical super-resolution microscopy, a technique developed for academic research over last few decades, has not yet been applied to the drug development processes used in pharmaceutical companies. This is primarily due to the lack of automation and dedicated data mining software. Here we describe a fully automated super resolution setup for live cell cultures in standard multiwell plates, and High Content Screening (HCS) based analysis software for single particle tracking. We have validated our approach on a relevant biological question, and we can estimate that the complete super-resolution screening protocol takes less than 8 hours for a p96 multiwell plate (from super-resolution acquisition to hits identification) and generate up to 80 Gb of data (i.e tracking parameters such as diffusion coefficient of single molecules or percent of immobile tracks per cell, ...). We also demonstrate that a classical HCS approach could lead to misidentification of compounds of interest as compared to our single molecule analysis. We therefore validate that sub-diffraction scale quantification is of particular interest in the drug discovery process.

Development of nanobody-based vectors that cross the blood brain barrier via receptor-mediated transcytosis for brain delivery of imaging or therapeutic agents

Romy Cohen^{1,2,3,4,5,6}, Brigitte Kerfelec^{1,2,3,4}, Daniel Baty^{1,2,3,4},
Marion David⁶, Michel Khrestchatisky^{3,5,6} and Patrick Chames^{1,2,3,4}

¹Inserm U1068, ²CNRS UMR7258, ³AMU U105, ⁴IPC, ⁵CNRS UMR7259, ⁶Vect-Horus

Abstract: Diseases of the nervous system are one of the main morbidity and mortality causes in the world and the leading cause of disability. The brain's blood vessels possess unique anatomical and physiological features, known as the blood-brain barrier (BBB), that control entry of molecules, infectious agents and cells in the central nervous system (CNS), but also substantially limit the delivery of pharmacological agents to the nervous tissue. The vast majority of the molecules with promising potential in the field of neurodegenerative disorders do not cross efficiently the BBB. As a result, more than 90% of CNS molecules developed by the pharmaceutical industry are abandoned in clinical phases after costly developments. Thus, strategies for CNS drug delivery are essential for improving existing drugs and bringing new drugs to the market. Among these is the development of vector molecules able to enhance the delivery of drugs across the BBB.

Camelids produce functional antibodies devoid of light chains in which the single N-terminal domain of the heavy chain is fully capable of antigen binding. These fragments, called single domain antibodies (nanobodies, Nb), can be produced as an independent domain and have several advantages owing to their unique properties of size (13kDa), stability, solubility and expression yield.

Our goal is to develop Nb highly specific for BBB receptors involved in receptor mediated transport (RMT), like the transferrin receptor, and optimize them as vector shuttles to transport pharmacological agents across the BBB into the brain. For this purpose, Nb against selected receptors expressed at the BBB are generated following immunization of llamas with membrane preparations from stable cell lines expressing these receptors, and construction of large Nb phage-display libraries. Differential selection and screening by flow cytometry are used to select Nb that cross-react with the extracellular domains of the target receptors. Nb candidates are then produced in *E. coli*, purified and their ability to bind BBB receptors are investigated by flow cytometry and immunocytochemistry on cell lines expressing the selected receptors. The finality of the project will be to assess the potential of the Nb candidates to cross the BBB and transport payloads into the brain tissue. The first step will be to use *in vitro* BBB models and measure the amount of labelled Nb that is transported across the primary endothelial cell monolayer. The second step will be to assess the potential of Nb of interest to cross the BBB *in vivo*, by measuring the biodistribution and the brain delivery of the labelled Nb. Ultimately, the Nb-based vector candidates will be conjugated to imaging or therapeutic agents to facilitate their delivery into the nervous tissue.

Bioréacteur à perfusion : étude de l'interaction entre la géométrie des matériaux, des contraintes de cisaillement induite et de la prolifération cellulaire.Bertrand DAVID

CentraleSupélec, Laboratoire de Mécanique des Sols, Structures et Matériaux, CNRS, UMR 8579, F-92295 Chatenay-Malabry, France

Problématique: Des substituts osseux sont souvent nécessaires pour le traitement de larges défauts osseux. Actuellement, les procédures chirurgicales de greffes autologues présentent un certain nombre de limitations. L'ingénierie tissulaire osseuse constitue une réponse prometteuse en proposant de produire, dans des bioréacteurs à perfusion, de véritables pièces de rechange à partir de matériaux microporeux associés à des cellules souches. De nombreuses équipes en France ou à l'international travaillent sur ce type de dispositif. Cependant, les cinétiques de prolifération des cellules et les transferts couplés de matière et de quantité de mouvement qui les conditionnent sont encore mal décrites dans de tels dispositifs, ce qui en freine l'éventuel transfert à la clinique. De manière générale, la conception des bioréacteurs en ingénierie tissulaire osseuse est basée sur une démarche empirique : un prototype est réalisé puis des expérimentations sont menées jusqu'à obtenir le résultat attendu comme, par exemple, un gain de prolifération cellulaire. Ce gain est essentiellement dû aux contraintes appliquées de manière tangentielle à la surface des matériaux par l'écoulement (cisaillement). L'environnement mécanique n'est pas optimisé dans le sens où il ne correspond pas à la plage de cisaillement pour laquelle l'effet sur la prolifération est le plus favorable. De plus, à l'échelle du bioréacteur, cet environnement est souvent inhomogène ce qui aboutit à la production de matériaux de remplacement cellularisés de façon inhomogène. Il est nécessaire de rompre avec cette approche et de rationaliser le développement de ces bioréacteurs. A ce jour, aucune loi de comportement décrivant la prolifération cellulaire à l'échelle locale (celle de la cellule) sous flux au sein d'un bioréacteur à perfusion n'est disponible dans la littérature. Deux stratégies peuvent être mis en œuvre pour établir cette loi. Soit partir de l'échelle locale directement soit partir de l'échelle dite macroscopique (celle du bioréacteur) pour ensuite redescendre à l'échelle de la cellule par analyse statistique. C'est cette seconde approche qui est présenté ici.

Objectif principal: S'appuyer sur les conditions d'écoulement au sein d'un bioréacteur ayant démontré sa capacité à produire des matériaux aboutissant à une formation osseuse chez le gros animal pour rompre avec la méthodologie empirique grâce à un dialogue calculs / expériences.

Méthodes: La simulation numérique (méthode de Boltzmann sur réseau) permet d'estimer quantitativement les contraintes pariétales locales exercées par le fluide. Ces données sont ensuite corrélées (Analyse statistique, PDF) à la distribution spatiale réelle de la phase cellulaire au sein du bioréacteur (débit 10 ml/min; fibroblastes NIH3T3; billes de plastique 2mm diamètre) pour le même empilement de matériaux (tomographie X, préparation échantillons méthode chimique, tétraoxyzide d'osmium).

Résultats: Une augmentation de la phase cellulaire après 7, 14 et 21 jours de culture a pu être mise en évidence par micro-tomographie. L'analyse de la distribution de phase cellulaire dans tout le volume du bioréacteur (3 cm³) a révélé une répartition homogène des cellules. De cellules individuelles au jour 1, des îlots cellulaires commencent à apparaître après 7 jours de culture puis fusionnent après 14 jours. Finalement, les cellules apparaissent sous la forme d'une couche épaisse uniforme (<400 µm), recouvrant les supports de culture après 21 jours. Les reconstructions 3D issues des acquisitions micro-tomographiques ont été utilisées comme modèle pour effectuer une simulation numérique de la contrainte de cisaillement. Alors que des contraintes de cisaillement comprises entre 95 et 130 MPa ont été préjudiciables à la prolifération des cellules, une contrainte de cisaillement inférieure à 95 MPa a été principalement associée à la présence massive de cellules.

Inciter l'activité de synthèse chez les enzymes hydrolytiques

B. Bissaro¹, J. Durand¹, X. Biarnés², T. Tandrup³, C. Dumon¹, P. Monsan^{1,4}, L. Lo Leggio³, A. Planas², S. Bozonnet¹, M.J. O'Donohue¹ et R. Fauré¹

¹LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France; ²Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 08017 Barcelona, Spain; ³Department of Chemistry, University of Copenhagen, Universitetsparken 5, DK-2100 Copenhagen, Denmark; ⁴Toulouse White Biotechnology, UMS INRA/INSA 1337, UMS CNRS/ INSA 3582, 3 Rue des Satellites 31400 Toulouse, France

Résumé : Alors que motifs saccharidiques et glycoconjugués sont des composants majeurs des systèmes vivants, leur synthèse chimique s'avère longue et fastidieuse, notamment du fait du grand nombre de combinaisons possibles pour lier les sucres entre eux. Or l'utilisation d'enzymes, en particulier des transglycosylases (TGs), pour la synthèse de liaisons glycosidiques est une voie prometteuse en raison de leur grande sélectivité, leur efficacité et leur capacité de fonctionner dans des conditions compatibles avec les principes de la chimie verte. Les TGs constituent une sous-classe des glycoside hydrolases (GHs) et partagent un même mécanisme catalytique avec leurs homologues GH hydrolytiques. La différence majeure entre les TGs et les GHs est la capacité des premières à catalyser des réactions de synthèse (dite transglycosylation) en milieu aqueux où la propension à l'hydrolyse devrait être très significative. Naturellement, il existe peu de transglycosylases par comparaison aux GHs hydrolytiques, beaucoup plus nombreuses et diverses. Par conséquent, une voie pour obtenir de nouvelles TGs est de mieux comprendre les bases moléculaires du mécanisme réactionnel et d'employer des approches d'ingénierie enzymatique pour manipuler cette partition hydrolyse/transglycosylation.

Nos travaux nous ont récemment permis de franchir un cap quant à la compréhension de la modulation de cette partition d'activités et de formuler ainsi des hypothèses pour la conversion de GHs hydrolytique en TGs. En effet, l'ingénierie aléatoire d'une α -L-arabinofuranosidase est à l'origine de la création de nouvelles TGs dont les activités sont quasi-exclusivement basculées en faveur de la synthèse, avec des taux de transfert proche de 100%,^[1] et l'ingénierie semi-rationnelle d'une endo-glycocéramidase a également amélioré significativement la synthèse de cellobiosides d'alkyles fonctionnalisés par voie enzymatique (résultats non publiés). Au-delà de cette réussite, l'analyse des résultats ainsi qu'une étude approfondie de la littérature^[2] nous permet de postuler que le basculement de l'activité des TGs vers la synthèse malgré la présence d'eau s'expliquerait par le fait que les TGs sont fondamentalement des enzymes paresseuses par rapport à leurs homologues hydrolytiques. En effet, alors que les GHs se lient de manière optimale au sucre donneur, permettant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, les TGs engageraient des interactions altérées avec le sucre donneur, ce qui serait intrinsèquement nuisible pour le déroulement de la réaction d'hydrolyse. Et, malgré son omniprésence, l'eau ne serait alors plus un substrat lors de la catalyse. Une reconnaissance accrue de molécules acceptrices complèterait les conditions nécessaires pour faire pencher définitivement l'activité vers la synthèse.

Ces hypothèses pourraient être étendues à d'autres GHs constituant un réservoir pour compléter la palette d'outils synthétiques pour le glycochimiste, et ainsi un domaine d'intérêt scientifique et technologique majeur.

Remerciements : La thèse de B.B. a été financée par l'INRA (contrat CJS). Une partie de ces travaux ont été financés par le projet « BioSurf – Novel Novel production strategies for biosurfactants » (projet ERA-NET n° 0315928A, ERA-IB10.039). La contribution de R.F. a partiellement été financée par la Région Midi-Pyrénées (bourse DESR-Recherche 14052246 dans le cadre de la CTP-B) et par une bourse de mobilité de l'INSA de Toulouse (2015). C.D. et R.F. remercie le programme de collaboration scientifique franco-danois de l'IFD pour sa participation sous la forme d'une bourse de voyage.

Références : ^[1]B. Bissaro, J. Durand, X. Biarnés, A. Planas, P. Monsan, M.J. O'Donohue, R. Fauré, ACS Catal., 2015, 5(8):4598-4611.^[2]B. Bissaro, P. Monsan, R. Fauré, M.J. O'Donohue, Biochem. J., 2015, 467(1):17-35.

Vectorisation de molécules-médicament par électroporation : apports de l'ingénierie tissulaire dans l'étude de ses mécanismes fondamentaux

L. Gibot¹, M-P. Rols¹

¹Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

Méthodologie : En modulant le potentiel transmembranaire des cellules, l'application d'impulsions électriques calibrées permet de perméabiliser de façon locale et réversible la membrane plasmique et/ou les organites intracellulaires : c'est le phénomène d'électroporation. Le principal avantage de cette technique physique est que la perturbation induite est parfaitement contrôlée dans le temps puisque la perméabilisation des membranes est transitoire et dans l'espace puisque seul le tissu situé entre les électrodes est affecté. Il existe deux développements majeurs de la méthodologie en clinique humaine. Ainsi, l'électroporation est une technique sûre pour transférer des acides nucléiques dans différents organes et tissus cibles : c'est l'électrotransfert de gène, ou EGT. L'efficacité de l'électrotransfert de gène dépend beaucoup du tissu ciblé. En effet, les études d'électrotransfert d'ADN réalisées *in vivo* ont démontré que l'efficacité de transfection est moindre dans les tissus riches en matrice extracellulaire car la migration électrophorétique des acides nucléiques est limitée. L'électroporation assure aussi l'entrée ciblée et massive de molécules cytotoxiques dans les cellules tumorales. Cette application clinique, appelée électrochimiothérapie (ECT), est utilisée dans de nombreux pays européens pour le traitement de cancers cutanés et sous-cutanés. En potentialisant la cytotoxicité des médicaments, l'ECT permet de diminuer les doses injectées aux patients, et donc de limiter leurs effets secondaires.

Résultats : Les résultats obtenus *in vivo* pour l'électrotransfert de molécules-médicaments (aussi bien les acides nucléiques que les molécules anticancéreuses) diffèrent, notamment en terme d'efficacité, de ceux obtenus *in vitro* sur des cultures classiques de cellules en monocouche. Bien que les cultures de cellules aient fourni d'importantes avancées scientifiques et conceptuelles, il est manifeste qu'en 2D les cellules perdent l'architecture propre au tissu dont elles proviennent, les signaux mécaniques et biophysiques tout comme les échanges et la communication intercellulaire. Notre équipe propose d'utiliser des modèles cellulaires en 3D développés par ingénierie tissulaire afin de comprendre le rôle de l'environnement tissulaire dans la vectorisation de molécules-médicaments par électroporation.

Discussion : Ainsi, nous avons démontré que le sphéroïde est un modèle pertinent pour étudier *in vitro* le processus d'électrochimiothérapie sur des cellules tumorales organisées en 3D [1] et s'avère aussi être un outil pertinent pour étudier l'électrotransfert de gène dans un contexte tissulaire [2]. De plus, en produisant des sphéroïdes mixtes, c'est-à-dire composés à la fois de types cellulaires sains et cancéreux, nous sommes capables de reproduire *in vitro* la sélectivité de l'électrochimiothérapie observée *in vivo* [3]. Enfin, grâce à des substituts cutanés humains produits par ingénierie tissulaire, nous étudions actuellement les effets du champ électrique sur l'architecture et composition de la matrice extracellulaire [4], ainsi que sur le remodelage du cytosquelette.

Conclusions : L'identification du rôle de chacun de ces acteurs, qui interagissent de façon dynamique et réciproque, permettra de comprendre les mécanismes de l'électrotransfert dans un contexte tissulaire et donc d'en améliorer la capacité de ciblage et l'efficacité, tout en limitant les dommages induits aux tissus environnants. La compréhension et la maîtrise de ces mécanismes permettront de développer de nouvelles stratégies pour augmenter l'efficacité de transfert tout en limitant les dommages induits aux tissus environnants, et ouvriront la porte à des applications cliniques en thérapie génique et à l'électrovaccination.

Références : [1] L. Gibot, L. Wasungu, J. Teissie, M.P. Rols, Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 167 (2013) 138-147. [2] L. Gibot, M.P. Rols, Progress and prospects: the use of 3D spheroid model as a relevant way to study and optimize DNA electrotransfer, *Current gene therapy*, 13 (2013) 175-181. [3] L. Gibot, M. Madi, R. Vézinet, M.P. Rols, Mixed Spheroids as a Relevant 3D Biological Tool to Understand Therapeutic Window of Electrochemotherapy, in: T. Jarm, P. Kramar (Eds.) *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies*, Springer Singapore, 2016, pp. 200-203. [4] M. Madi, M.P. Rols, L. Gibot, Efficient *In Vitro* Electropermeabilization of Reconstructed Human Dermal Tissue, *The Journal of membrane biology*, 248 (2015) 903-908.

Targeted nanoparticles for multimodal molecular imaging in a mouse model of atherosclerosis

M. Larivière¹, C. Lorenzato¹, A. Hémadou¹, L. Adumeau³, M. Noubhani², X. Santarelli², M.-J.

Jacobin-Valat¹, S. Mornet³, G. Clofent-Sanchez¹, J. Laroche-Traineau¹

¹CRMSB, CNRS UMR 5536, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France; ²Bordeaux-INP, CBMN, CNRS UMR5248, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France; ³ICMCB-CNRS UPR9048, 87 Avenue du Dr. Albert Schweitzer, 33608 Pessac Cedex, France

Introduction: Cardiovascular diseases are the first cause of sudden deaths worldwide. The majority of them are due to a condition called atherosclerosis, an inflammatory disease of large and medium arteries, resulting in the build-up of atheroma plaques from circulating cholesterol. These plaques evolve under the combined influence of soluble (cytokines) and cellular (macrophages, platelets, etc.) factors. It is their rupture into the blood flow that causes the potentially lethal ischaemic accident. The diagnosis of rupture-prone atheroma requires high resolution molecular imaging.

Methods: Human antibodies specific for the atheroma lesions have previously been selected by phage display biotechnology¹. TEG4 HuAb is a promising candidate due to its targeting of activated platelets (integrin α IIb β 3), highly represented within the plaque. scFvs (single chain Fragment variable) were processed from the selected phage-HuAbs and produced in *Pichia pastoris*. Their specificity was further tested by immunohistochemistry (IHC) on atherosclerotic vessel sections. Original nano-objects called VUSPIOs² (Versatile Ultra-small SuperParamagnetic Iron Oxide) – DyLight (Near Infra Red fluorochrome) were designed for multi-modal imaging. They were then functionalized with our antibodies in a regioselective way to preserve their activity. A site-specific conjugation approach via engineered thiols in scFv fragments was used at different scFv/NP ratios. Preservation of the reactivity was assessed via IHC and kinetics of binding were determined with Surface Plasmon Resonance (SPR). ApoE^{-/-} mice developing atheroma plaques were injected with the functionalized NPs and imaged.

Results: The specificity of TEG4 scFvs has been confirmed in IHC studies on murine, rabbit and human lesional tissue rich in platelets. SPR analyses of scFv-NPs grafted with increasing numbers of scFvs showed a gradual increase in the avidity. The same was true regarding the intensity of atheroma plaque recognition in IHC. When injected into animal models of the pathology, the objects bound to the lesions *in vivo*, allowing for optical near infra-red fluorescence (NIRF) and magnetic resonance imaging of the lesions.

Conclusions: When multiple copies of scFv fragments were grafted to NPs, the avidity was increased. This enabled the NPs to reach its target protein *in vivo*, giving encouraging results both in NIRF and MR imaging in ApoE^{-/-} mice. The multifunctional feature of these NPs allows for the development of a set of complementary imaging techniques at multiple scales from cell to animal.

Acknowledgements : Mélusine Larivière's thesis is funded both by an IdEx grant and an NHMRC grant. This work has been supported by two public grants of the French National Agency (ANR) (1) in the frame of the Investments for the Future Program, referenced ANR-10-LABX-57 and named TRAIL (Translational Research and Advanced Imaging Laboratory) MIMATHUMAB and (2) within the context of SVE5 program, named ATHERANOS.

References : [1] Deramchia K, Jacobin-Valat MJ, Vallet A, Bazin H, Santarelli X, Sanchez S, Dos Santos P, Franconi JM, Claverol S, Bonetto S, Clofent-Sanchez G: *New human antibody fragments homing to atherosclerotic endothelial and subendothelial tissues: an in vivo phage display targeting* Am J Pathol 2012, 180:2576-89. [2] Jacobin-Valat MJ, Deramchia K, Mornet S, Hagemeyer CE, Bonetto S, Robert R, Biran M, Massot P, Miraux S, Sanchez S, Bouzier-Sore AK, Franconi JM, Duguet E, Clofent-Sanchez G: *MRI of inducible P-selectin expression in human activated platelets involved in the early stages of atherosclerosis*. NMR Biomed 2010.

Strategies to improve the survival of implanted mesenchymal stem cells in tissue engineered constructs

Delphine Logeart-Avramoglou¹, Joseph Paquet¹, Adrien Moya¹, Julie Boisselier², Nathanaël Larochette¹, Elodie Lefebvre², Mathilde Barbosa¹, Véronique Larreta-Garde², Emmanuel Pauthe², Hervé Petite¹

¹Biomaterial for Health Group, ERRMECe, Department of Biology, Université de Cergy-Pontoise,

²Laboratory of Osteo-articular Bioengineering and Bioimaging, (B2OA) UMR 7052 CNRS-Université Paris Diderot Paris.

Mesenchymal stem cells/ multipotent stromal cells/ (MSCs) play a key role in the maintenance of tissue integrity and in tissue repair. These cells have also major potential for cell therapy and regenerative medicine applications such as for bone repair. However, the efficacy of stem cell-based tissue engineering (TE) approaches in experimental and clinical studies, although promising, remains suboptimal. The underlying reasons for this limited success are not yet fully understood but, one major limitation is the poor survival rate of MSCs observed after transplantation. The hostile environment that MSCs faced upon implantation is considered as a prime reason. When loaded on synthetic material constructs devoid of pre-existing vascular network, MSCs encounter an ischemic environment with low oxygen tension and nutrient deprivation and, consequently, a considerable bioenergetic challenge. To meet this challenge, our laboratory explores various strategies in order to sustain the long term viability of the TE-cell constructs up to the host vascular bed establishment.

One strategy relies on approaches of MSC preconditioning to alleviate the ischemia-mediated cell death. We specifically examined the hypothesis that preconditioning MSCs into a quiescent state in order to lower their energy demands may contribute to their long-term viability under ischemic conditions. We provided evidence that driving MSCs into a quiescence state allows them, through a metabolic reprogramming, to withstand exposure to severe, continuous, near-anoxia and total glucose depletion for up to 14 consecutive days *in vitro* and to improve their survival when implanted in an ischemic environment *in vivo*.

Another strategy relies on the development of scaffolds that favour the cell viability. Previous studies from our lab established that *in situ* supplying glucose (that acts as the main metabolic fuel for MSCs in severe hypoxia) significantly enhances their survival under ischemia (Deschepper *et al.* 2011 and 2013). Our aim is developing a gel that continuously delivers glucose to MSCs in order to maintain their survival post-implantation. To this aim, hydrogels containing fibrin, starch (a glucose polymer) and α -amyloglucosidase (AMG) were engineered. Presence of AMG (free or encapsulated) into the starch-loaded fibrin gel will provide continuous production of glucose *in situ* via enzymatic hydrolysis of starch. These hydrogels were self-supported and released glucose amounts in accordance with that required by MSCs for their survival. MSCs loaded in such hydrogels exhibited significant enhanced survival rates than those loaded in fibrin (control) hydrogels after 14 days both *in vitro* and *in vivo*.

Impression 3D, impression 4D et diagnostic moléculaire.

C. A. Marquette¹

¹Univ Lyon, Université Lyon1, CNRS, INSA, CPE-Lyon, ICBMS, UMR 5246, 43, Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Résumé : Le groupe Biopuce de l'UMR 5246 (ICBMS) travail depuis plus de 10 ans sur les problématiques de développement de dispositifs de diagnostic moléculaire et d'interfaçage entre biologie et matériaux actifs. Au cours des trois dernières années, une nouvelle thématique basée sur des techniques de fabrication additive a été peu à peu intégrée aux activités du groupe.

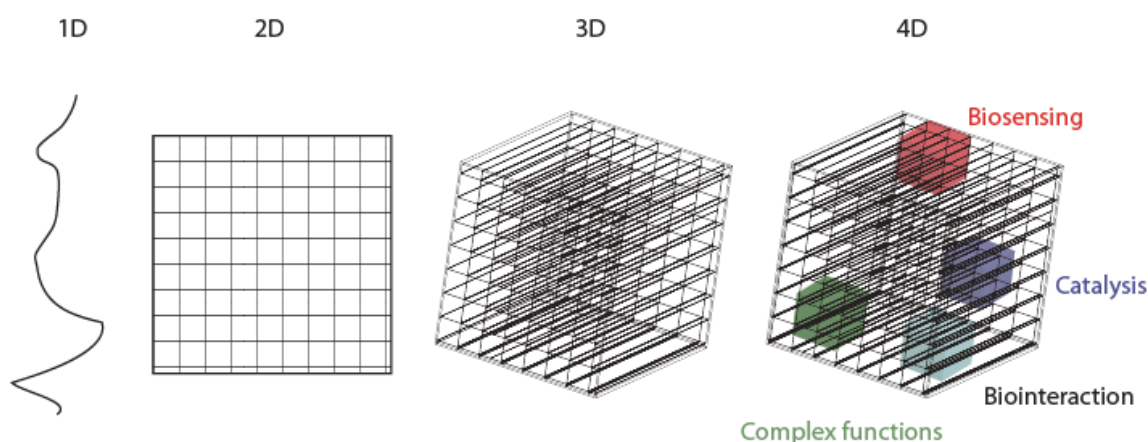
Ainsi, l'impression 3D a été intégrée en tant qu'axe de recherche à part entière, menant à des innovations dans des domaines aussi variés que l'ingénierie tissulaire, les dispositifs implantables ou les dispositifs pour le diagnostic. Une plateforme de service d'impression 3D pour la santé unique au monde (3d.FAB : Fabric of Advanced Biology) a également été créée autour de cette nouvelle activité afin de permettre l'accélération de l'innovation dans ce domaine (financement FEDER en cours).

L'impression de tissus a pu être démontrée pour la production de peau et de cartilage avec comme ambition la production de greffons autologues dans les 3 années à venir (1-3).

L'impression de dispositifs diagnostics, grâce au concept d'impression 4D incluant dans les objets imprimés certaines fonctions biologiques ou biochimiques, est un champ de recherche tout à fait novateur et porteur d'innovation dans lequel le groupe possède une certaine avance grâce à son savoir-faire historique dans le génie enzymatique et biomoléculaire (4).

Enfin, les dispositifs implantables, pouvant être basés sur l'impression de matériaux inertes ou actifs, sont actuellement en développement afin de permettre la levée d'un certain nombre de verrous techniques (formes et fonctionnalités adaptés à chaque patient, complexité impossible à atteindre par moulage).

Un certain nombre d'exemples représentatifs de chacun de ces axes seront présentés ainsi que les infrastructures et expertises disponibles sur la plateforme 3d.FAB.



Références : 1. Pourchet L., Blum L.J. and Marquette C.A., Creation of an open-source 3D bioprinter for living cells. International Bioprinting Congress, 9th-10th July 2015, Singapore. Oral communication. 2. Pourchet L., Thepot A., Dos Santos M., Boher A., Blum L.J. and Marquette C.A., Skin equivalent through bioprinting. 3D bioprinting conference, Maastricht, 26th January 2016. Oral communication. 3. Marquette C.A., Pourchet L., Thépot A., procédé de fabrication de substituts cutanés par dépôt additif, N° dépôt 15 63461 (30/12/2015). 4. Mandon C.A Blum L.J. and Marquette C.A., Adding biomolecular recognition capability to 3D printed objects: 4D printing. 3D Medicine & Pharmaceutics Printing Conference, 3rd edition – 27th January 2016 – Maastricht. Oral communication.

Bioengineering biofuel cells to provide power for implantable medical devices

J.P. Alcaraz¹, S. El Ichi,¹ J. Thelu¹, A. Zebda¹, P. Cinquin¹, D.K. Martin¹

¹ Université de Grenoble Alpes, CNRS / TIMC-IMAG (UMR 5525), Grenoble

Summary : A wide variety of implantable medical devices are used to monitor physiological parameters of the body, perform therapy and supplement or even entirely replace complex biological functions. Cardiac pacemakers, cardioverter-defibrillators, neuro-stimulators, drug delivery chips and cochlear implants are some examples. Lithium batteries are usually the first choice in supplying power to such implantable medical devices, but with the disadvantage of needing replacement, recharging or refuelling over the long-term. An alternative is to power implantable devices with biofuel cells that (i) utilise enzymes to catalyse biofuels such as glucose and oxygen, or (ii) mimic naturally occurring biological ion transport processes. We have developed and optimized an enzymatic biofuel cell that utilises the glucose and oxygen that is freely available in the extracellular fluids, with the advantage that such a biofuel cell could operate independently for prolonged periods without needing external recharging or refuelling. The design and the *in vivo* performance of a powerful enzymatic glucose biofuel cell (GBFC), able to produce a power output of 38.7 μW , were demonstrated in our previous studies [1,2,3]. Further, we demonstrated that an enzymatic biocathode based on a conducting chitosan nanofibrous 3D network electrically connected to laccase [4] and coated with a semi permeable and biocompatible nanoporous chitosan-based film is able to deliver a continuous current of $-0.3 \text{ mA}\cdot\text{mL}^{-1}$ during 20 days.

Nonetheless, improvements to the long term stability and biocompatibility of the GBFC are required to bring it to a stage for human preclinical testing. Recently we demonstrated that this biocathode conserved its catalytic activity after implantation for 6 months in a rat [5]. We achieve such long-term implantation with the use of a nanoporous chitosan film to enhance the biocompatibility for the electrodes when the GBFC is implanted in rat, rabbit and sheep. For example the performance and the stability of the electrodes are improved by using chitosan of different molecular weights and introducing different cross-linkers such as genipin and tripolyphosphate in the design of the 3D electrodes for the GBFC. These results indicate that the choice of electrode materials plays a key role in the stability and the biocompatibility of a GBFC.

For the biomimetic approach to biofuel cell development, we are developing and optimising a biomimetic membrane to create a biofuel cell that utilises electrolytes for fuel. The biomimetic fuel cell generates electricity by imitating salt transport that occurs naturally in the membranes of cells in the body [6,7]. The prototype for the biomimetic fuel cell utilises a thin membrane that comprises a lipid bilayer supported by a porous polymeric membrane [8]. In addition to optimising the biology of the transport proteins and their incorporation into the membrane, an important dimension to the work is the bioengineering of biocompatible containers to enable the implantation of the biomimetic biofuel cell.

References: Cinquin P, Gondran C, Giroud F, Mazabrard S, Pellissier A, Boucher F, Alcaraz J-P, Gorgy K, Lenouvel F, Mathé S, Porcu P, Cosnier S (2010). *A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. PLoS ONE*, 5(5), e10476; [2] Zebda A, Gondran C, Le Goff A, Holzinger M, Cinquin P, Cosnier S (2011). *Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. Nature Communications*, 2: 370-375; [3] Zebda A, Cosnier S, Alcaraz J-P, Holzinger M, Le Goff A, Gondran C, Boucher F, Giroud F, Gorgy K, Lamraoui H, Cinquin P (2013), *Scientific Reports*, 3, 1516; [4] El Ichi S, Zebda A, Laaroussi A, Reverdy-Bruas N, Chaussy D, Belgacem MN, Cinquin P, Martin DK (2014), *Chemical Communications*, 50, 14535 ; [5] El Ichi S, Zebda A, Alcaraz J-P, Laaroussi A, Boucher F, Boutonnat J, Reverdy-Bruas N, Chaussy D, Belgacem MN, Cinquin P, Martin DK (2015), *Energy & Environmental Science*, 8:1017-1026; [6] Cinquin P, Martin DK (2007). "Biomimetic artificial membrane device", *US 20100178592 A1* ; [7] Battle AR, Valenzuela SM, Mechler A, Nichols RJ, Praporski S, di Maio IL, Islam H, Girard-Egrot AP, Cornell BA, Prashar J, Caruso F, Martin LL, Martin DK (2009). *Novel engineered ion channel provides controllable ion permeability for polyelectrolyte microcapsules coated with a lipid membrane. Advanced Functional Materials*, 19:201-208; [8] Stidder B, Alcaraz JP, Liguori L, Khalef N, Bakri A, Watkins E, Cinquin P, Martin DK (2012). *Biomimetic membrane system composed of a composite interpenetrating hydrogel film and lipid bilayer. Advanced Functional Materials*, 22: 4259-4267

Développement d'un nouvel implant pour le traitement Intra-utérin du Spina bifida

C. Falentin-Daudré¹, J-S Baumann¹, J. Stirnemann², V. Migonney¹

¹LBPS/CSPBAT, UMR CNRS 7244, Institut Galilée, Université Paris 13 Sorbonne Paris Cité, 99 avenue JB Clément 93430 – Villetaneuse, ²FETUS – EA 7328, Maternité Hôpital Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Le spina bifida (SB) ouvert ou myéломéningocèle (MMC) est une malformation congénitale grave liée à un défaut embryonnaire de fermeture du tube neural qui touche 1 naissance sur 1000 dans le monde.[1, 2] Au cours du développement, la moelle épinière embryologiquement anormale et ouverte est exposée à l'environnement intra-utérin entraînant des lésions neurologiques irréversibles. La malformation est détectée par une échographie lors de la première moitié de la grossesse. Cette malformation peut être corrigée chirurgicalement à la naissance, mais cela ne permet pas de restaurer la fonction normale de la partie affectée de la moelle épinière. Un essai thérapeutique réalisé au Children's Hospital of Philadelphia a montré qu'une cure chirurgicale prénatale de la malformation en deuxième moitié de grossesse, par hystérotomie, permettait d'améliorer significativement le pronostic, en limitant l'exposition de la moelle épinière à l'environnement intra-utérin. Cependant, la morbidité maternelle de cette intervention la rend difficilement acceptable. Afin de limiter la morbidité maternelle et de permettre une intervention précoce, nous avons développé un implant à base de polycaprolactone[3] sur lequel des polymères bioactifs sont greffés afin de guider la réponse biologique *in vivo* de l'hôte en contrôlant l'inflammation.[4] Cet implant permettrait de couvrir et de protéger la moelle épinière durant le développement foetal.

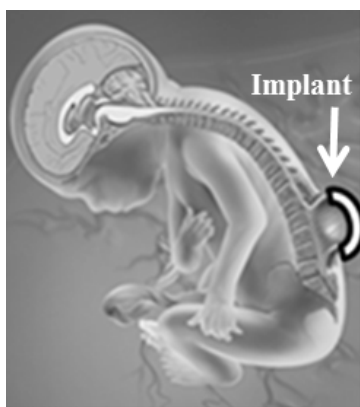


Figure 1 : Implant couvrant le défaut lié à la malformation du SB

Références

- [1] B. M. Patten American Journal of Anatomy, 1953, *Vol 93 (3)*, 365-395.
- [2] N.S. Adzick, E. A. Thom, C. Y. Spong, J. W. Brock, P. K. Burrows, M. P. Johnson, L. J. Howell, J. A. Farrell, M. E. Dabrowiak, L. N. Sutton, N. Gupta, N. B. Tulipan, M. E. D'Alton, D. L. N. Farmer Engl. J. Med., 2011, *Vol 364 (11)*, 993-1004.
- [3] C. Vaquette, J. J. Cooper-White Acta Biomaterialia, 2011, *Vol 7 ()*, 2544–2557
- [4] Huot S., G. Rohman, M. Riffault, A. Pinzano, L. Grossin, V. Migonney Bio-medical materials and engineering, 2013, *Vol 23 (4)*, 281-288.

3D-printing for tissue engineering of nasal cartilage

E Perrier-Groult¹, M Durbec², L Pourchet³, M Padeloup¹, D Vertu-Ciolino², , C Mandon³, C Marquette³, F Disant², F Mallein-Gerin¹

¹CNRS-UMR5305, Lyon, France. ²E. Herriot Hospital, Lyon, France. ³3D Fab, Lyon, France

INTRODUCTION: Nasal reconstruction remains a challenge for every oral and maxillofacial surgeon. Demands for replacements to fill nasal cartilage defects, after cancer resection and trauma or in cosmetic rhinoplasty, are increasing. The current attitude for reconstruction is to use autologous cartilage grafts of various origins (septal, auricular or costal) which aim to restore physiological anatomy. The Neck and Head Surgery Service of Pr. Disant, recognized in the field of nasal reconstruction is, at present, the pioneer of extracorporeal rhinoplasty. This technique consists in reconstructing in the operating room a nasal septum architecture from cartilaginous elements taken from the patient. A clinical study showed that the dimensions required for the reconstructed frameworks are very similar from patient to patient, opening the way for the standardization of the reconstruction process. However, the drawback of these grafts is the quantity of cartilage which may be limited depending on the patient's condition, sometimes resulting in incomplete and non-anatomical reconstruction. In this context, synthetic implants could be used: they offer the advantage of providing the necessary amount of material and respond to the immediate need of an aesthetic structure. A candidate material is high-density porous polyethylene (HDPP) already used in facial reconstruction.

METHODS: Our project aims to create by 3D printing an original HDPP framework. However, HDPP implants are still associated with high rates of extrusion and infection and poor biocompatibility. Thus, the idea is to fill the pores and cover the surface of the scaffold with a cartilage gel produced by tissue engineering. This cartilage gel is formed by embedding autologous chondrocytes in fibrin hydrogel. We have developed a new protocol to amplify chondrocytes from a small biopsy of cartilage and to stimulate their cartilage matrix production in hydrogel, under the control of selected soluble factors (used in their drug forms).

RESULTS: Our immunohistological and biochemical in vitro analyzes show that human nasal chondrocytes embedded in fibrin hydrogel synthesize proteins characteristic of cartilage such as type II collagen and aggrecan. When the hydrogel is cast into a HDPP support, we observe by confocal microscopy the presence of cartilage that covers and fills the pores of the framework. After implantation of these constructs in nude mice, our observations highlight the stability of the newly synthesized matrix.

DISCUSSION & CONCLUSIONS: We have developed an original protocol allowing expansion of chondrocytes and their production of cartilage in 3D-printed framework mimicking the shape of nasal cartilage. This new technique should improve the biocompatibility of the implant. The next step is the establishment of a Medical Device and the development of an implant for validation as an Advanced Therapy Medicinal Product.

Les Affitins : une boîte à outils pour les biotechnologies

Axelle Renodon-Cornière, Ghislaine Béhar, Michel Chérel, Barbara Mouratou, Frédéric Pecorari

Equipe 13 Recherche en Oncologie Nucléaire, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes- Angers (CRCNA) - UMR 892 INSERM 6299 CNRS, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes

Les anticorps sont des outils attractifs pour les applications de détection, de capture et de ciblage. Ils permettent d'obtenir des réactifs spécifiques et affins pour des cibles variées. Cependant, leur structure complexe, leur taille importante et les coûts de production associés élevés ne les rendent pas forcément idéaux pour des applications exigeantes. Pour pallier à ces inconvénients, des protéines d'affinité artificielles alternatives aux anticorps sont développées depuis une vingtaine d'années.

Dans ce contexte, notre équipe travaille sur le **développement de petites protéines d'affinité de 7kDa, appelées Affitins**. Ces protéines dérivent de la protéine d'archée extrêmophile Sac7d et de ses homologues, et combinent de nombreuses propriétés favorables. Les Affitins sont obtenues en couplant l'utilisation de banques combinatoires correspondant à la mutation aléatoire d'au moins 10 acides aminés de la protéine parente, à une sélection in vitro par ribosome display contre une cible d'intérêt. Ces protéines ont la particularité d'être chimiquement et thermiquement stables (jusqu'à 90°C) et de résister aux pH extrêmes (pH 0 à 13), des propriétés inaccessibles aux anticorps. Etant robustes et bien exprimées de façon recombinante, **elles trouvent naturellement de nombreuses applications en biotechnologie**.

Ces dix dernières années, nous avons démontré leurs utilisations en tant que réactifs pour diverses applications telles qu'ELISA, Western-blot, immunolocalisation, biocapteurs fluorescents autonomes, puces à protéines, inhibition d'activités biologiques in vivo, inhibition enzymatique in vitro.

Récemment, nous avons décrit et nous présenterons les Affitins en tant qu'agents pour concevoir des colonnes d'affinité afin de purifier spécifiquement diverses protéines cibles, qu'elles soient des anticorps ou d'autres protéines. Les conditions d'utilisation, pH acides et basiques, mettent en relief les avantages et la robustesse des Affitins pour ce type d'applications, ainsi que leur grande spécificité.

L'ensemble de ces propriétés nous permettent aussi d'envisager les Affitins comme un outil prometteur dans le développement d'une nouvelle classe de vecteur pour l'imagerie in vivo et la thérapie personnalisée en ciblant des biomarqueurs connus de pathologies.

3D Longitudinal MRI studies on novel tissue-engineered bone constructs in living rats : volume & perfusion assessments

N. Koonjoo¹, C. Tournier², A.J. Trotier¹, D. Wecker³,
W. Lefrançois¹, D. Letourneur⁴, J. Amédée², EJ. Ribot¹, S. Miraux¹

¹Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS/ Université de Bordeaux, Bordeaux, France, ²BIOTIS, U1026, INSERM, Bordeaux, France, ³Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne; ⁴Laboratory of Vascular Translational Science, U1148, INSERM, Paris, France

Purpose: The reconstruction of large volume bone defects remains challenging because, when using biomaterials, a defect in vascularization is usually observed. Consequently, innovative matrices have to be developed. Furthermore, non-invasive longitudinal assessment of the bone regeneration is needed. Being a non-ionizing technique, Magnetic Resonance Imaging is highly suited for *in vivo* evaluation of tissue repair longitudinally. Here, three differently conditioned bone scaffolds were synthesized, containing either hydroxyapatite (HA) or fucoidan (Fuco) that has been proven to promote angiogenesis or both. Knowing that the cortical bone exhibits much shorter T2 relaxation times than implanted scaffolds and that substantial bone marrow fat composition hampers scaffold detection, a 3D balanced Steady State Free Precession (bSSFP) sequence was developed to be coupled to a proper fat suppression module and to a banding artifacts correction method. Then, a 3D DCE-MRI (Dynamic Contrast Enhanced-MRI) was performed to analyze the evolution of angiogenesis within the scaffolds. The aim of our work was to determine using multi-modal 3D MRI whether combined HA-Fuco constructs shall significantly stimulate osteogenesis and angiogenesis for correct bone tissue repair.

Methods: Biomaterials: Three differently conditioned bone constructs, each composed of a pullulan/dextran scaffold associated with either HA (PUDNA-HA) or Fuco (PUDNA-Fuco) or both (PUDNA-HA-Fuco) were implanted into a large bone defect situated in femoral rat condyles (n=15). **MRI protocol:** MRI scans at 7T were performed at 1, 3 and 5 weeks after implantation. A 3D Water-selective bSSFP sequence was implemented [1] with the following parameters: five 150µs-hermite subpulses with an intensity ratio of 1:2:3:2:1 (interpulse delay of 200µs); TE/TR=2.6/5.2ms; reception bandwidth (BW)=75kHz; FOV=30x35x25mm³; matrix=192x192x128; 4 phase offsets; FA=27°; 2 averages; acquisition time (TA)=4min15s. 3D images were reconstructed after a “Sum-Of-Square” of the 4 offsets, eliminating the banding artifacts. DCE T1-weighted images were acquired using a 3D gradient-echo sequence: TE/TR=1.9/6.5 ms; BW=75kHz; FOV=25x30x14mm³; matrix=128x96x32; FA=30°; 1 average (19s); 144 repetitions; TA=45min36s. After acquiring 3 baseline images, Gd-DOTA (Guerbet) was intravenously administered as a rapid bolus (0.2 mmol of Gd/kg). **Image analysis:** Volumetric data were obtained through pixel count of the biomaterial hyperintense signal on the bSSFP images using Amira Software. All DCE-MRI analyses were performed on a pixel-wise basis using in-house programs developed with Matlab. To minimize effects from inter-individual physiological variation and contrast agent dose variability, each pixel was normalized to a mean reference signal measured in leg muscle and the noise. The area under the signal curve obtained after the injection of Gd-DOTA (AUC) during 45 minutes was computed for each pixel.

Results: The binomial pulse induced a drop in fat signal located subcutaneously and within the bone marrow in the entire 3D FOV. The biomaterials were easily detected as hyper-intense areas within the bone marrow. The PUDNAHA and PUDNA-HA-Fuco constructs showed a rapid decrease in the hyperintense signal volumes (Fig. 1) whereas the PUDNA-Fuco constructs revealed a much slower decrease. These patterns were correlated with cortical bone formation observed with µCT. In parallel, AUC maps (Fig. 2) showed that the biomaterial AUC values shortened over time to reach the one of healthy bone on week 5 for PUDNA-HA and PUDNA-HA-Fuco constructs. On the contrary, the AUC value of the PUDNA-Fuco constructs remained high. These results are in accordance with vessel formation measured by histology.

Discussion: The 3D water-selective bSSFP sequence allowed precise assessments of bone regeneration within PUDNA-HA and PUDNA-HA-Fuco biomaterials longitudinally. AUC analysis enabled to appreciate angiogenesis in the bone defects. This current research would surely lead to a non-invasive MRI protocol to evaluate bone regeneration.

References: [1] Ribot EJ, Wecker D, Trotier AJ, Dallaudière B, Lefrançois W, et al. (2015) *Water Selective Imaging* and bSSFP Banding Artifact Correction in Humans and Small Animals at 3T and 7T, Respectively. PLoS ONE 10(10): e0139249.

Le gallium, un adjuvant prometteur pour le comblement des pertes osseuses à l'aide de substituts phosphocalciques

I. Strazic Geljic^{ab}, N. Melis^a, F. Boukhechba^{ab}, I. Guberovic^c, B. Didak^c, S. Schaub^a, C. Mellier^b, P. Janvier^c, A. Schmid Alliana^a, H. Schmid Antomarchi^a, JM. Boulter^d, E. Verron^c, JC. Scimeca^a

^aUniv. Nice Sophia Antipolis, CNRS, Inserm, iBV, 06100 Nice, France, ^bGRAFTYS SA, 13854 Aix-en-Provence, cedex 3, France, ^cLIOAD, Université de Nantes, Inserm UMR791, BP84215, 44042 Nantes, France, ^dCNRS, CEISAM, UMR6230, 44322 Nantes, France

Les substituts phosphocalciques sont couramment utilisés comme biomatériaux en chirurgie reconstructrice de l'os. Dans le cadre de pathologies telles que l'ostéoporose, les tumeurs osseuses ou bien les infections, ces composés pourraient également assurer une libération *in situ* d'agents pharmacologiques d'intérêt. D'autre part, du fait de son effet inhibiteur sur l'ostéoclaste, la cellule responsable de la dégradation de l'os, l'élément semi-métallique gallium (Ga) est utilisé dans le traitement de différents troubles liés à une résorption accélérée du tissu osseux. Sachant que le gallium peut être incorporé dans la structure de biomatériaux à base de phosphate de calcium (CaP), ce type de composites (CaP/Ga) a fait l'objet de la présente recherche.

In vitro, et par rapport au contrôle CaP, la culture de cellules osseuses sur un substrat CaP/Ga met en évidence une inhibition de la différenciation ostéoclastique. *In vivo*, dans un modèle animal murin, le comblement d'un défaut osseux avec un composite CaP/Ga conduit à l'ostéointégration de l'implant, ainsi qu'à la reconstruction tissulaire avec colonisation par la moelle osseuse. De plus, l'analyse quantitative en 3D (microtomographie aux rayons X ; microscopie optique par génération de seconde harmonique ou SHG) révèle une augmentation de la quantité du tissu osseux néoformé au sein des implants CaP/Ga comparés au contrôle CaP. Dans une autre série d'expériences, et étant donné son potentiel anti-tumoral déjà rapporté dans la littérature, nous nous sommes intéressés aux effets que le gallium pourrait exercer directement dans le contexte d'une tumeur osseuse. Nous avons pour cela utilisé un modèle *in vitro* mimant l'impact des cellules tumorales sur des pré-ostéoclastes. En sélectionnant une lignée cellulaire cancéreuse agressive choisie pour son tropisme osseux, nous démontrons que le gallium inhibe la différenciation ostéoclastique induite par les cellules tumorales. De plus, il diminue la viabilité et la prolifération des cellules cancéreuses, tout en modulant l'expression de gènes impliqués dans le processus ostéolytique au niveau de la métastase. L'ensemble de ces données indique que des biomatériaux phosphocalciques dopés en gallium constituent des substituts osseux compatibles avec la prolifération des cellules osseuses, et capables d'inhiber l'ostéoclastogénèse. De plus, par rapport au substitut osseux de base, l'ajout de gallium au sein de ce type d'implant améliore la repousse osseuse. Ainsi, ces propriétés font de ces biomatériaux de bons candidats pour le traitement de différentes pathologies conduisant à une ostéopénie. D'autre part, de par ses effets inhibiteurs sur les cellules cancéreuses et sur la résorption osseuse, le gallium constitue un candidat extrêmement intéressant pour le couplage avec des substituts phosphocalciques destinés à une application dans un contexte tumoral osseux. Grâce à ce double effet bénéfique du gallium, à la fois sur le blocage du cercle vicieux actif au sein des métastases osseuses ainsi que sur la reconstruction tissulaire, ces composites bioactifs représentent une nouvelle génération prometteuse de substituts osseux. Enfin, dans le contexte du traitement des pathologies osseuses par chirurgie mini invasive, les formes injectables de ce type de dispositifs médicaux combinés constitue un axe de recherche en plein développement.

Engineering extracellular vesicles for therapy and imaging

A. K A Silva¹, N. Luciani¹, F. Gazeau¹, and C. Wilhelm¹

¹Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, CNRS and Université Paris Diderot, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris cedex 13, France.

Introduction: Extracellular vesicles (EVs) are multifaceted subcellular entities that may represent a new generation of bio-camouflaged drug/ nanoparticle delivery system.

Methods: In a top-down procedure, our group has engineered nanoparticle/drug-loaded EVs from precursor cells previously loaded with this cargo. For this purpose, parent HUVEC cells or THP1 macrophages were first incubated with the desired payload and allowed to internalize it. Starvation stress was employed to induce the release of vesicles high-jacking the cargo from their precursor cell.

Results: By this method, EVs could encapsulate a set of nanoparticles regardless their chemistry or shape, such as iron oxide nanoparticles, iron oxide nanocubes, gold/iron oxide nanodimers, gold nanoparticles and quantum dot. Different hybrid nanovesicles were designed: magnetic, magnetic-fluorescent and magnetic-metallic vesicles, either single component or multicomponent. These hybrid vesicles were able to generate heat when submitted to an alternating magnetic field and could be monitored by fluorescence imaging or MRI. Dual drug/nanoparticle EV loading was also feasible by this method. We demonstrated that vesicles from THP-1 cells could be loaded with iron oxide nanoparticles and different therapeutic agents irrespective to their molecular weight, hydrophobic, hydrophilic and amphiphilic character. Thereby, magnetic vesicles were loaded with a chemotherapeutic drug (doxorubicin), anticoagulant protein (tissue-plasminogen activator (t-PA)), or two photosensitizer (disulfonated tetraphenylchlorin (TPCS2a) or meta-tetra-(hydroxyphenyl)-chlorin (mTHPC). The theranostic potential of mTHPC-loaded magnetic EVs was tested in vivo in a murine tumoral model. Vesicles could be tracked in vivo by dual-mode imaging, combining optical imaging and MRI. The engineered EVs were found to induce an efficient photodynamic action, as evidenced by tumor growth curves and histological analysis.

Conclusion: In brief, we succeeded in customizing EV by engineering them to display several nanoparticle/drug cargoes featuring therapeutic and imaging properties both in vitro and in vivo.

Impression moléculaire sous contrôle de la lumière

Strale PO¹, Azioune A², Bugnicourt G¹, Lecomte Y¹, Chahid M¹, Studer V¹

¹Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, Bordeaux, France ²Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Constantine, Algérie

Résumé : Les techniques d'impression moléculaire appliquées à la biologie ambitionnent de reproduire le microenvironnement cellulaire en contrôlant l'attachement de biomolécules sur un substrat à l'échelle micrométrique. Au fil des années, l'amélioration de la résolution spatiale de ces approches s'est faite au détriment de la rapidité et de la facilité à générer des *patterns* protéiques.

Nous avons récemment développé une stratégie baptisée LIMAP (pour *Light-Induced Molecular Adsorption of Proteins*) permettant l'impression de multiples espèces protéiques de manière rapide et fiable avec une résolution d'environ 500 nm. LIMAP repose sur l'utilisation d'un photo-initiateur capable de moduler finement les propriétés anti-adhésives de polymères en réponse à une exposition à la lumière UV. LIMAP repose également sur l'utilisation d'un modulateur spatial de lumière ou DMD (pour *Digital Micromirror Device*) permettant une projection quantitative, plein champ de lumière UV. Ces 2 caractéristiques combinées permettent l'impression quantitative d'au moins 3 espèces protéiques différentes.

Les champs d'application de cette approche sont multiples. LIMAP, en permettant l'immobilisation de protéines à l'échelle de la molécule unique, permet de tester les interactions biomoléculaires. D'autre part, l'impression de molécules d'adhésion cellulaire fonctionnelles permet d'induire, à la demande, une réponse cellulaire mais également de positionner précisément plusieurs types cellulaires et donc de réaliser des co-cultures de manière extrêmement contrôlée.

La modulation de la lumière UV par le DMD peut aussi être mise à profit afin de générer des structures tridimensionnelles de forme et de rigidité contrôlée. L'utilité de cette capacité sera illustrée à travers l'exemple de la réponse du cône de croissance à un gradient de biomolécules immobilisées.

Thématique

« Biomarqueurs et médecine personnalisée »

Screening and evaluation of new radioligands for alpha-synuclein PET imaging

F. Chauveau¹, M. Verdurand¹, E. Levigoureux¹, M. Mendjel¹, W. Zeinyeh², C. Bouillot³, F. Cadarossanesaib³, S. Lancelot¹, T. Billard^{2,3} and L. Zimmer^{1,3}

¹Univ. Lyon, Lyon Neuroscience Research Center (CRNL), team BIORAN; CNRS UMR5292; Inserm U1028, Univ. Lyon 1, F-69003 Lyon, France ; ²Univ. Lyon, Institute of Chemistry and Biochemistry (ICBMS); CNRS UMR5246; Univ. Lyon 1, F-69003 Lyon, France ; ³CERMEP-Imagerie du Vivant, F-69003 Lyon, France

Introduction : The accumulation of aggregated α -synuclein (α -syn) in multiple brain regions is a neuropathological hallmark of synucleinopathies like Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy. A pre-mortem diagnosis tool would improve early diagnosis, monitor disease progression and therapeutic efficacy. While suitable amyloid- β (A β) PET radioligand have been developed like [¹¹C]PIB and [¹⁸F]AV45, no selective α -syn PET ligand has been identified to date. One PET tracer, BF227, labelled with carbon-11 or fluor-18, has demonstrated interesting binding properties towards α -syn fibrils in vitro [1] and α -syn glial inclusions in MSA patients [2]. The first step in this project consisted in developing a simple screening assay to find selective α -syn ligands using competitive autoradiography with [¹⁸F]BF227 and candidate molecules. The next step was the radiolabeling and preliminary evaluation of two benzoxazoles molecules selected from this screening step.

Methods : α -syn and A β fibrils were obtained by incubating commercial human recombinant proteins at 200 μ M, 37°C. Rats were stereotaxically injected with 5 μ L (200 μ M) of α -syn or A β fibrils in the striatum. Animals were scanned in vivo (Inveon, Siemens) and /or the brains were cryostat-cut for ex vivo / in vitro autoradiography (Bio-Imaging Analyzer, BAS-5000, Fujifilm).

[¹⁸F]BF227 was used for competitive in vitro autoradiography using nanomolar concentration of radiotracer and 1-10 μ M BF227, PIB or Thioflavine T. After [¹⁸F]BF227 incubation with or without cold competitors, sections were washed in ethanol/water solutions before exposition on phosphorimaging plates. Fluorescent staining of fibrils was performed on brain slices with Thioflavine S (ThS).

Results and Discussion : We have set up an in vitro autoradiography screening assay that enabled testing the capacity of several original candidate molecules to compete with [¹⁸F]BF227 binding sites on A β and α -syn fibrils. Current work is ongoing to validate an in vitro filter binding assay on isolated fibrils to measure affinity. Initial evaluation of two newly radiolabeled molecules in fibril-injected rats demonstrated their ability to cross the blood-brain barrier and to detect the presence of a nanomolar quantity of fibrillary aggregates of proteins relevant to neurodegenerative diseases. Selectivity towards α -syn vs A β will be further explored in transgenic mice overexpressing human α -syn vs APP as well as in human brain slices from Parkinson vs Alzheimer patients.

References: 1. Fodero-Tavoletti MT et al. Eur J Pharmacol. 2009;617(1-3):54-58. 2. Kikuchi A et al. Brain. 2010;133(Pt 6):1772-1778.

Acknowledgement : Dr Mathieu Verdurand is sponsored by Fondation Plan Alzheimer.

Carbamylation: a protein modification associated with aging

L. Gorisse^{1,2}, C. Pietrement^{1,3}, V. Vuiblet^{1,4,5}, C.E.H. Schmelzer⁶, M. Köhler⁶, L. Duca¹, L. Debelle¹, P. Fornès⁷, S. Jaisson^{1,2,8} and P. Gillery^{1,2,8}

¹University of Reims Champagne-Ardenne, "Extracellular Matrix and Cell Dynamics" Unit CNRS UMR 7369, Reims 51100, France. ²Laboratory of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Reims 51100, France. ³Department of Pediatrics (Nephrology unit), American Memorial Hospital, University Hospital, Reims 51100, France. ⁴Department of Nephrology and Transplantation, University Hospital, Reims 51100, France. ⁵Laboratory of Biopathology, University Hospital, Reims 51100, France. ⁶Institute of Pharmacy, Faculty of Natural Sciences I, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle 06120, Germany. ⁷Department of Pathology (Forensic Institute), University Hospital, Reims 51100, France. ⁸Laboratory of Pediatric Biology and Research, Maison Blanche Hospital, University Hospital, Reims 51100, France.

Résumé : Aging is associated with tissue alterations which may be explained by nonenzymatic post-translational modifications of proteins (NEPTMs) such as glycation and oxidation (1). A still poorly investigated reaction is carbamylation, which corresponds to the binding of isocyanic acid, a urea by-product, to protein amino groups. This process leads to the formation of carbamylation-derived products (CDPs) including homocitrulline (HCit), which results from lysine carbamylation. Previous in vitro experiments have shown that carbamylation contributes to the alteration of structural and functional properties of proteins. For instance, our laboratory has demonstrated that carbamylation altered the conformation of type I collagen triple helix and impaired its interactions with inflammatory cells (2, 3). Some pathological contexts like vascular diseases or renal failure are known for amplifying these chemical modifications, higher concentrations of carbamylated plasma proteins being correlated with morbi-mortality. In recent works, we showed that tissue HCit was significantly increased in a mice model of chronic renal failure leading to an accumulation of CDPs in the organism (4). However, physiological occurrence of carbamylation and the metabolic fate of carbamylated proteins during aging are still unclear. To address this issue, we have evaluated tissue accumulation of CDPs over time in three mammalian species with different lifespans (5). We have observed that HCit concentrations progressively increased in murine tissues from birth to 2 years, the highest content being found in skin. The same evolution was observed in bovine and human skins, with 11.5 and 8.1-fold increases between the youngest and oldest subjects, respectively. Interestingly, this reaction impacted more intensely matrix proteins, type I collagen and elastin because of their long half-life. We also showed that HCit increase in skin was more pronounced in species with shorter lifespans suggesting that animal species with longer lifespans develop efficient turnover, repair, or degradation mechanisms restricting tissue accumulation of CDPs. To study the potential turnover of carbamylated proteins in vivo, we used a mouse model of dietary cyanate-induced carbamylation. We observed that skin collagen exhibited the weakest HCit elimination. This could be due to a slower turnover or to the contribution of still unidentified mechanisms taking part in the renewal and remodeling of damaged proteins. These results show that carbamylation is a physiological reaction associated with aging, leading to a progressive accumulation of CDPs in tissues. Such modifications could induce turnover alterations and cellular dysfunctions contributing to age-related complications. Future studies will be devoted to the identification of potential mechanisms of CDP elimination to develop preventive strategies.

References: 1. Jaisson S, Gillery P (2010) Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem* 56(9):1401–1412. 2. Jaisson S, et al. (2006) Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem Biol* 13(2):149–159. 3. Jaisson S, et al. (2007) Carbamylation differentially alters type I collagen sensitivity to various collagenases. *Matrix Biol* 26(3):190–196. 4. Pietrement C, Gorisse L, Jaisson S, Gillery P (2013) Chronic Increase of Urea Leads to Carbamylated Proteins Accumulation in Tissues in a Mouse Model of CKD. *PloS One* 8(12):e82506. 5. Gorisse L, et al. (2016) Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(5):1191–1196.

Détection de nouveaux biomarqueurs EEG de l'activité cérébrale temporale interne grâce à des enregistrements EEG simultanés multi-échelles

Laurent Koessler^{1,2,3}, Thierry Cecchin^{1,2}, Sophie Colnat-Coulbois⁴, Jean-Pierre Vignal^{1,2,3}, Jacques Jonas^{1,2,3}, Hervé Vespignani^{1,2,3}, Georgia Ramantani^{1,2,5}, Louis Georges Maillard^{1,2,3}

¹CNRS, CRAN, UMR 7039, France, ²Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandoeuvre-lès-Nancy, 54516, France, ³Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Service de Neurologie, Nancy, 54000, France, ⁴Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Service de Neurochirurgie, Nancy, 54000, France, ⁵Epilepsy Center, University Hospital Freiburg, Freiburg, 79106, Germany

La contribution électrique en électroencéphalographie (EEG) de surface des sources cérébrales profondes est encore actuellement débattue. C'est tout particulièrement le cas pour les sources situées au niveau des structures temporales mésales en raison de l'enroulement géométrique qui tend à créer un champ électrique fermé, de la distance importante qui les séparent des électrodes de scalp et du bruit de fond électriques générés par les sources néocorticales. Dans une étude récente (Koessler et *al.*, 2015), nous avons analysé, grâce à une approche très originale d'enregistrements EEG simultanés multi-échelles, la contribution électrique des sources temporales mésales à l'EEG de surface.

Les enregistrements EEG multi-échelles reposent sur l'utilisation conjointe de capteurs positionnés sur le cuir chevelu (EEG de surface) et dans le cortex cérébral (EEG intracérébrale ou SEEG). Ces enregistrements ne peuvent être réalisés que dans le cadre de bilans pré-chirurgicaux des épilepsies partielles pharmorésistantes. Dans ce modèle d'épilepsie et grâce aux signaux SEEG, des biomarqueurs épileptiques (pointes intercritiques) ont été identifiés et marqués automatiquement dans le temps (t_0) puis classés dans l'espace selon trois réseaux anatomiques différents (mésales, mésales plus néocorticales et néocorticales). Des cartographies intracérébrales ont été utilisées afin de s'assurer de la cohérence des réseaux que ce soit au niveau temporel et spatial. Nous avons ensuite moyennés les enregistrements simultanés multi-échelles (EEG-SEEG) afin de caractériser la contribution moyenne sur l'EEG de surface de chaque réseau intracérébral.

21 réseaux (9 mésales, 5 mésales plus néocorticales et 7 néocorticales) issus de 7 patients ont été étudiés. Les signaux EEG de surface moyennés ont montré pour les réseaux mésales, la présence de biomarqueurs épileptiques d'amplitude moyenne de 7,2 μ V, de durée égale à 72ms et de rapport signal à bruit de 16,5dB. Cette contribution électrique a été observée de façon significative ($\alpha = 0,05$; test de Walsh) sur les électrodes temporo-basales antérieures. La cartographie 3D d'amplitude des signaux de surface a montré des projections électriques différentes entre les réseaux mésales et les autres réseaux. Cette différence a pu être mise en évidence de façon automatique grâce à une méthode de classification hiérarchique ascendante.

Malgré les caractéristiques physiques et électriques des structures temporales mésales, notre étude est donc la première à démontrer, grâce à des enregistrements EEG simultanés multi-échelles, que les sources électriques situées dans ces structures mésales engendrent en surface du cuir chevelu des biomarqueurs EEG. Cette étude EEG multi-échelle ouvre donc une nouvelle voie de recherche dans la détection de nouveaux biomarqueurs EEG de surface en épilepsie ou en cognition.

Biomarqueurs en IRM quantitative multiparamétrique

B. Leporq¹, M. Viallon¹, D. Martel², A. Nemeth¹, S.A. Lambert¹,
H. Ratiney¹, D. Bendahan³, B.E. Van Beers⁴, O. Beuf¹

¹Université de Lyon; CREATIS CNRS UMR 5220, Inserm U 1206, INSA-Lyon, ²Bernard and Irene Schwartz Center for Biomedical Imaging, Department of Radiology, NYU school of Medicine, ³Université Aix-Marseille, CRMBM, CNRS UMR 6612, Marseille, France, ⁴Université Paris Diderot, Centre de Recherche sur l'inflammation Inserm UMR 1149, Sorbonne Paris Cité.

Introduction: Qu'il soit prédictif ou descriptif, associé à une molécule, ou qu'il dépende de technologies aussi diverses que la génomique, la transcriptomique, la protéomique, ou encore de l'imagerie, le biomarqueur va constituer la base de la médecine personnalisée du XXI^e siècle. A travers ce résumé, nous présentons une méthode d'IRM quantitative et multiparamétrique visant à fournir des biomarqueurs dans diverses applications cliniques.

Méthode: A partir d'une acquisition IRM unique de type multi-écho de gradient, une reconstruction dédiée a été développée, validée puis brevetée. Cette dernière intègre une méthode de quantification du contenu lipidique, de sa composition en acide gras, la volumétrie automatique du tissu adipeux viscéral et sous cutanée et la quantification de la susceptibilité magnétique du tissu. Après validation, cette méthode a été évaluée dans diverses applications cliniques par le biais de collaborations nationales et internationales.

Résultats: Au Centre de Recherche sur l'inflammation, des résultats préliminaires ont permis d'identifier des biomarqueurs répondant à une problématique clinique majeure: la distinction entre les formes graves et bénignes de maladies non-alcooliques du foie, dont la prévalence mondiale atteint un niveau alarmant.

Au Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale, son application sur le muscle a permis d'identifier des biomarqueurs descriptifs de dystrophies et seront évalués à travers une étude multicentrique visant à étudier la réponse au traitement dans la maladie de Charcot-Marie.

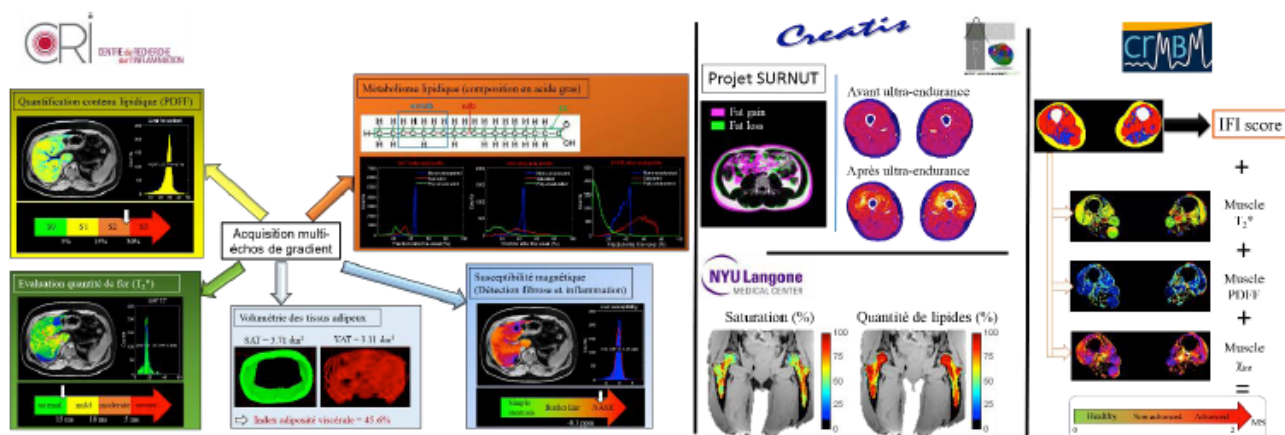
Au Centre de Recherche en Acquisition et Traitement de l'Image pour la Santé, à travers une étude visant à évaluer les effets de la surnutrition, son application a permis de quantifier l'augmentation des volumes de tissus adipeux et de détecter les modifications du métabolisme lipidique notamment l'activation des voies métaboliques comme celle de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse des MUFA. D'autre part, à travers le projet MUST, les effets de l'ultra-endurance sur le muscle ont pu être détectés et quantifiés (<http://www.creatis.insa-lyon.fr/MUST/>).

Enfin, au NYU langone medical Center, après avoir évalué sa faisabilité sur la moelle osseuse fémorale, des différences de composition en acide gras en fonction de la localisation (col, trochanter, diaphyse) ont été mises en évidence. Une étude à plus grande échelle est en cours d'élaboration pour le développement de modèle descriptif et prédictif d'ostéoporose, intégrant entre autre, les métriques fournies par cette méthode.

Discussion: L'information quantitative et multi-échelles (organique, métabolique et moléculaire) fournie par cette méthode apporte une réponse à l'hétérogénéité de nombreux processus pathologiques. La disponibilité et la rapidité de l'acquisition permettent son intégration dans un protocole clinique, et donc les études pour l'évaluation de la réponse aux traitements. Néanmoins, si le potentiel est montré, d'autres études visant à standardiser ces biomarqueurs, à étudier la répétabilité et la reproductibilité de cette méthode sont nécessaire.

(1) B. Leporq *et al.* NMR biomed 2014;27:1211-21

(2) (2) B. Leporq *et al.* Magn Reson Med 2015. DOI: 10.1002/mrm.25895



Ondes guidées dans l'os cortical, validation *ex vivo* et mesures *in vivo*

J.G Minonzio¹, Q. Vallet¹, N. Bochud¹, P. Laugier¹

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB), F75006, Paris

Résumé: La propagation d'ondes ultrasonores guidées dans l'enveloppe des os longs (os cortical) est sensible aux propriétés élastiques et géométriques du guide d'onde. L'étude des ondes guidées dans ce contexte présente donc un fort potentiel pour l'évaluation des caractéristiques du guide d'onde osseux et pour la prédiction du risque de fracture (ostéoporose). Le principe de la mesure consiste à relier les caractéristiques des ondes guidées (vitesses de phase ou nombres d'onde en fonction de la fréquence) aux caractéristiques physiques du guide d'onde osseux (épaisseur, coefficients élastiques, porosité) au moyen d'une approche de type problème inverse. La méthode a été testée sur des échantillons osseux *ex vivo*, en collaboration avec le LYOS (Inserm UMR 1033, Lyon). Des corrélations significatives ont été observées entre les épaisseur et de porosité estimées par ultrasons et par scanner rayons X μ CT. Les coefficients de corrélation de Pearson sont respectivement égaux à $r^2 = 0,92$ ($p < 0,05$, RMSE = 0,2 mm) et 0,7 ($p < 0,05$, RMSE = 2 %). La méthode a également été testée *in vivo* sur des sujets sains au radius (avant-bras), avec une bonne corrélation ($r^2 = 0.7$, $p < 0.05$, RMSE = 0.2 mm) entre épaisseur corticale obtenue par ultrasons et scanner périphérique rayons X (HR- p QCT). Cette étude a été menée en collaboration avec le B2OA (UMR CNRS7052, Paris) et la structure Fé- dératrice de Recherche IMOSAR de l'Université Denis Diderot (Paris). Une étude clinique Pilote est actuellement menée avec le Professeur Christian Roux de l'Hôpital Cochin (Centre d'Evaluation des Maladies Osseuses, Paris) dans le cadre du contrat de collaboration avec la start-up Azalée. L'objectif de cette étude est d'évaluer la discrimination entre patientes fracturées et non-fracturées au moyen des biomarqueurs ultrasonores.



Figure 1. Dispositif actuel : sonde, électronique de commande et interface.

Les auteurs remercient Azalée et la Fondation pour la Recherche Médicale (projet n° FRM DBS201311228444) pour leur soutien logistique et aide financière.

Fluorescent Peptide Biosensors for probing kinase activities: new tools for cancer diagnostics

C. Prével, M. Peyressatre, M. Pellerano, CM Tilmaciu & M.C. Morris

Institut des Biomolécules Max Mousseron, CNRS, UMR 5247, Université de Montpellier

Cyclin-dependant kinases (CDK/cyclins) constitute a class of heterodimeric kinases whose members play a central role in coordinating cell cycle progression and participate in a wide variety of essential biological processes including transcription, neuronal differentiation and metabolism (Lim and Kaldis 2013). These kinases are frequently hyperactivated in cancer cells and contribute to sustain unrestrained proliferation, thereby constituting established cancer biomarkers and attractive pharmacological targets for anticancer therapeutics (Asghar et al. 2015; Peyressatre et al. 2015). However, probing and quantifying the hyperactivity of these kinases in living cells remains challenging, their detection being restricted to antigenic approaches following cell or tissue fixation, whilst activity measurements are limited to discontinuous, endpoint radioactive assays.

In order to probe cyclin-dependent kinases in their physiological environment, we have developed a toolbox of fluorescent biosensors through conjugation of environmentally-sensitive probes to synthetic modular polypeptides derived from kinase-specific substrates. These non-genetic biosensors offer a straightforward means of sensing subtle alterations in kinase activity in real time, *in vitro* and in living cells following facilitated delivery by cell-penetrating peptides (Van TNN et al. 2014). These selective chemical probes allow to study the kinetics of cyclin-dependent kinase activity and to quantify differences between healthy and cancer cell lines, and in response to therapeutics. This technology is further suitable for probing and alterations in kinase activities in mouse cancer models. In particular, we have engineered a CDK4/Cyclin D-specific biosensor which we have implemented to quantify CDK4/Cyclin D activity in healthy and pathological skin biopsies (Prével et al. 2016), and a CDK5/p25-specific biosensor which provides means of monitoring the dynamics of kinase activation in neuronal cells and assessing its hyperactivation in glioblastoma. More recently we have engineered carbon-nanotube peptide biosensor conjugates through functionalization at the surface of multiwall carbon nanotubes and have found that these conjugates constitute efficient scaffolds, penetrate readily into living cells and report on CDK/Cyclin activities more robustly than fluorescent peptide kinase biosensors.

These fluorescent biosensors constitute attractive tools for cancer diagnostics, for monitoring cancer progression and evaluating response to therapeutics, whilst also enabling development of sensitive assays for high throughput screening and offering promising perspectives for drug discovery (Prével et al. 2014).

References :

- [1] Lim and Kaldis (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140, 3079-93
- [2] Asghar et al. (2015) The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy, 14, 130-146
- [3] Peyressatre M., Prével C., Pellerano M., Morris M.C. (2015) Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers : from small molecules to peptide inhibitors. *Cancers* 7, 179-237.
- [4] Van TNN, Pellerano M., Lykaso S., Morris M.C. (2014) Fluorescent protein biosensor for probing CDK/Cyclin activity in vitro and in living cells. *ChemBioChem*, 15, 2298-305
- [5] Prével, C., Pellerano, M., Gonzalez-Vera, JA, Henri P, Meunier L, Vollaire J., Josserand V. & Morris, M.C. Fluorescent peptide biosensor for monitoring CDK4/cyclin D hyperactivity in melanoma cells, mouse xenografts and skin biopsies. *Biosensors and Bioelectronics*, *in revision*
- [6] Prével, C., Pellerano, M., Van, T.N.N., Morris, M.C. (2014) Fluorescent Biosensors for High Throughput Screening of Protein Kinase Inhibitors. *Biotechnology J.* 9, 253-65

Vascular Endothelial (VE)-cadherin is a biomarker of targeted therapies in cancer: first study with Sunitinib in kidney cancer.

H. Polena^{1,2,3*}, J. Creuzet^{1,2,3*}, A. Deroux^{1,2,3,4}, A. Sidibé^{1,2,3}, A Mgharbel^{1,2,3}, J-L. Quesada⁴, C. Roelants^{1,2,3}, O. Filhol^{1,2,3}, C. Cochet^{1,2,3}, E. Blanc⁵, C. Ferlay-Segura⁵, G Pages⁶, JM Ferrero⁶, LMauge⁷, D Helley-Russick⁷, S Oudard⁷, B Escudier⁸, S. Négrier⁵, I. Vilgrain^{1,2,3}

¹INSERM, Unité 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France ²UGA-Grenoble 1, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38041, France ³CEA, DRF/BIG, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France ⁴Grenoble University Hospital, Division of Internal Medicine, Grenoble, F-38043, France ⁵Unicancer, Léon Bérard Center, F-69008 Lyon, France ⁶IRCAN, CNRS UMR 7284, INSERM U 1081-UNS, F-06107 Nice ⁸Gustave Roussy Center, F-94800 Villejuif ⁷INSERM U 970, PARCC (Paris cardiovascular research Center), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité. Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, F-75015 Paris

Résumé : An established paradigm shift in cancer therapy is to target the vascular network that feeds a tumor because it is now well established that the development of neovascularization (angiogenesis) in tumors is a key event for both tumor growth and metastatic processes. Vascular endothelial (VE)-cadherin is the major endothelial protein specifically expressed in all vascular endothelial cells and is responsible for endothelium integrity. Its adhesive properties are regulated by post-translational processing, including tyrosine phosphorylation in its cytoplasmic domain, and cleavage of its extracellular domain (called sVE). In this study, we aimed at analyzing (a) the effects of antiangiogenic molecules on VEGF-induced VE-cadherin structural modifications (phosphorylation and cleavage), (b) the RCC tumor microenvironment, and its potency to induce VE-cadherin cleavage in 2D and 3D cell culture, and (c) the level of sVE in the serum of mRCC patients treated with targeted therapies such as sunitinib. We demonstrate that VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation at site Y685 and cleavage was almost completely impaired by sunitinib treatment, but not by temsirolimus. These observations strongly suggest that VE-cadherin tyrosine phosphorylation is a prerequisite for sVE generation. Furthermore, we found that VEGF and MMPs, such as MMP2 and MMP9, secreted by RCC cells may be involved in the release of sVE in a dose-dependent manner. In addition, the level of sVE in mRCC patients (n=115) was higher than in healthy donors (n=95). In three different clinical studies we have investigated sVE in mRCC patients treated with Sunitinib (TORAVA (n=20) Lyon), SUVEGIL (n=32) (Nice), PREINSUT (Paris)). In all the studies, the patients exhibiting a decrease in sVE levels within 15 to 30 days were responders to the therapy. Because VE-cadherin is a target for new cancer therapies such as tyrosine kinase inhibitors, our data highlight the interest for the bioassay sVE (quantification in blood) that could be used in the future for patient follow up.

L'IRM cérébrale du sodium : un outil prometteur pour détecter précocement la dégénérescence axonale

Adil Maarouf, Bertrand Audoin, Sylviane Confort-Gouny, Maxime Guye, Jean Pelletier, Jean-Philippe Ranjeva, Wafaa Zaaraoui

CRMBM UMR CNRS 7339 Aix-Marseille Université, Marseille, France

But de l'étude : Le sodium joue un rôle primordial dans les processus de dégénérescence de l'axone, principal phénomène à l'origine du handicap permanent dans la sclérose en plaques (SEP). L'association entre l'inflammation (source de stress oxydatif) et la démyélinisation (source de la réorganisation des canaux sodiques) entraîne un déséquilibre entre production et consommation d'ATP dans l'axone, ce qui conduit à une surcharge intracellulaire de sodium. Cette accumulation de sodium conduit à l'accumulation intracellulaire de calcium entraînant la dégénérescence axonale. L'IRM cérébrale du sodium est un nouvel outil permettant l'évaluation de cette accumulation de sodium *in vivo*. Ce travail vise à évaluer l'accumulation de sodium chez les patients à tous les stades de la maladie et les relations potentielles entre la concentration de sodium et le niveau de handicap physique et cognitif.

Matériel et méthodes : Trois études ont été réalisées pour évaluer l'intérêt du sodium dans la SEP, incluant respectivement 26, 20 et 58 patients. Les IRM du sodium ont été réalisées à 3T sur un imageur clinique Verio (Siemens) avec les paramètres suivants : séquence de projection radiale 3D adaptée en densité, TE=200µs, TR=120ms, 17000 projections, temps acquisition = 34 min, résolution isotropique de 3.6 mm, filtre de Hanning, deux tubes de 50mM de sodium sont placés dans le FOV pour la quantification. La chaîne de traitement des images comprend la reconstruction des images ²³Na radiales (Matlab), le débruitage avec un filtre ricien, la création de cartes 3D ²³Na quantitatives (SPM8), le réaligement de ces cartes avec les images 1H hautes résolution (3D-MPRAGE) suivi des étapes de normalisation et lissage sous SPM8 et de l'analyse voxel par voxel de ces cartes. Dans la première étude, les patients tous rémittents ont été divisés en 2 groupes, selon la durée de la maladie. Dans la deuxième étude, les patients inclus étaient de forme progressive, population où l'atteinte axonale est plus prépondérante. Les patients ont également été divisés en 2 groupes, selon leur forme primaire ou secondaire. Enfin la troisième étude s'est intéressée aux atteintes cognitives dans la SEP, atteintes qui sont probablement plus liées aux atteintes axono-neuronales qu'à l'atteinte inflammatoire démyélinisante. De même, les patients ont été divisés en 2 groupes, selon l'existence ou pas d'une atteinte cognitive.

Résultats : La première étude a permis de démontrer l'existence d'une accumulation anormale de sodium dès le stade précoce de la maladie en particulier en dehors des lésions focales, dans les tissus cérébraux d'apparence normale. Cette accumulation de sodium se propage de manière très importante affectant l'ensemble du cerveau au stade avancé de la SEP. L'accumulation de sodium dans la substance grise (SG) cérébrale des patients a été corrélée au handicap mesuré par l'EDSS (p=0.015), à la durée d'évolution de la maladie (p=0.030). Dans les formes progressives, l'accumulation de sodium touche la SG. L'analyse de la cartographie a montré que l'augmentation de sodium est limitée aux structures motrices et sensorielles dans les formes primaires (p=0.001). En revanche, dans les formes secondaires, l'accumulation est plus étendue, touchant à la fois les structures motrices et sensorielles mais aussi les structures impliquées dans des processus cognitifs élaborés (p=0.001). Cette accumulation est corrélée à l'EDSS (score handicap clinique) dans le cortex pré-moteur et au MSFC (score handicap cognitif) dans le cortex préfrontal. Enfin, chez les patients présentant des troubles cognitifs, cette accumulation de sodium touche la SG et en particulier le néocortex (en particulier les structures temporales, frontales et le précunéus). Dans ces trois études, cette accumulation de sodium est un phénomène distinct de l'atrophie.

Discussion : L'accumulation de sodium dans la SEP est un phénomène précoce, évoluant au cours de la maladie. Elle touche les structures motrices, en particulier sous tentorielles, au début de maladie, la substance blanche (lésionnelle et d'apparence normale) dans les formes évoluées mais qui restent inflammatoires, le néocortex lorsqu'il existe une atteinte cognitive et la SG dans les formes progressives, avec une distinction entre les formes primaires et les formes secondaires. Ces accumulations sont corrélées aux échelles de handicap physique et cognitif. Elles sont en accord avec les présentations cliniques et les connaissances anatomopathologiques des différentes formes étudiées. Ces accumulations surviennent aussi bien dans les lésions vues en IRM conventionnelle que dans les régions d'apparence normale (blanche et grise). La SG, particulièrement touchée par la dégénérescence axonale, est un siège majeur de l'accumulation de sodium. Enfin cette accumulation de sodium est un phénomène distinct de l'atrophie, voire précède ou explique mieux le handicap que l'atrophie. L'IRM du sodium est donc un outil intéressant pour détecter précocement l'atteinte axonale, en particulier dans la substance grise.

Autres thématiques

Exercise training exacerbates the sensitivity of the type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rat heart to ischaemia-reperfusion injury.

M. Desrois¹, C. Lan¹, M. Macia¹, B. Portha², D. Bailbe², B. Giannesini¹, D. Bendahan¹, J. Movassat², P.J. Cozzone¹ and M. Bernard¹.

¹Aix-Marseille Université, CNRS UMR 7339, Marseille, France. ²Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), Equipe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine (B2PE), Université Paris-Diderot, Paris.

Background: Exercise training plays a major role in improving the physiology of diabetes. Information about the effects of exercise training on diabetes-induced myocardial dysfunctions is lacking. Consequently, we aimed to investigate the effect of exercise training on the sensitivity of the type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rat heart to ischaemia-reperfusion injury by using a multiparametric approach combining ³¹P magnetic resonance spectroscopy with simultaneous measurement of contractile function and biochemical assays in plasma and freeze-clamped hearts.

Materials and Methods: 8-month-old male GK (n=11, trained GK) rats ran 60 min on a treadmill 5 days per week at a speed of 20 m/min for 7 weeks and were compared with age-matched male Control Wistar (n=6) and untrained GK (n=11). After exercise training, isolated rat hearts were perfused with 0.4 mM palmitate, 3% albumin, 11 mM glucose, 3U/L insulin, 0.8 mM lactate and 0.2 mM pyruvate for 24 min before switching to 1.2 mM palmitate during 32 min low-flow (0.5 ml/min⁻¹.g wet wt⁻¹) ischaemia. Next, flow was restored with 0.4 mM palmitate buffer for 32 minutes. ATP, phosphocreatine (PCr), Inorganic phosphate (Pi), phosphomonoesters (PME) and intracellular pH (pH_i) were followed using ³¹P magnetic resonance spectroscopy with simultaneous measurement of contractile function. Glucose and free fatty acids (FFAs) were measured in plasma. Total adenine nucleotides (TAN) and energy charge (EC) were determined in freeze-clamped tissues by H.P.L.C.

Results: Glucose was significantly higher in both trained (p=0.0002) and untrained (p=0.0238) GK versus Control. FFAs were similar in all groups. Heart to body weight ratio were significantly higher in both untrained and trained diabetic groups (p=0.0122 and p<0.001) versus Control. Heart weight was increased in both untrained and trained diabetic groups (p=0.0296 and p<0.0001) but at a higher level in trained diabetic group (p=0.0087) versus untrained GK. During reperfusion, rate pressure product, index of cardiac performance, was significantly lower (p<0.0001) in trained GK group compared with untrained GK and Control groups. Recoveries of PCr and ATP during reperfusion were significantly decreased in trained GK rat hearts compared with Control and untrained GK rat hearts (p<0.05). TAN and EC were significantly decreased in trained GK compared with untrained GK (p=0.0024 and p=0.0005) and Control (p=0.0052 and p=0.0156) rat hearts.

Conclusion: The intensity of exercise training exacerbated the sensitivity of the type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat to myocardial ischaemia-reperfusion by impairing energy metabolism and myocardial performance. Other exercise protocols and/or therapeutic approaches need to be explored to limit myocardial ischaemia-reperfusion injury in type 2 diabetes.

**Reduction of Survivin levels by XPO1 inhibition enhances radiation response
in preclinical models of rectal cancer**

Isabel Ferreiro-Neira^{1,2,5}, Nancy E. Torres^{1,2}, Lukas F. Liesenfeld^{1,2}, Carlos H.F. Chan^{1,2}, Yosef Landesman³, William Senapedis³, Sharon Shacham³, Theodore S. Hong^{1,4} and James C. Cusack^{1,2}

¹*Division of Surgical Oncology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA*, ²*Harvard Medical School, Boston, MA*, ³*Karyopharm Therapeutics, Natick, MA*, ⁴*Department of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA*, ⁵*EA 7435 – IMOTION, Université de Bordeaux, France*

Purpose: Combination of radiation with radiosensitizing chemotherapeutic agents improves outcomes for locally advanced rectal cancer. Current treatment includes 5FU-based chemoradiation prior to surgical resection; however pathological complete response varies from 15 - 20%, prompting the need to identify new radiosensitizers. XPO1 mediates the nuclear export of critical proteins required for rectal cancer proliferation and treatment resistance. We hypothesize that inhibition of XPO1 may radiosensitize cancer cells by altering the function of these critical proteins resulting in decreased radiation resistance and enhanced antitumoral effects.

Experimental Design: To test our hypothesis, we used the selective XPO1 inhibitor, Selinexor, to inhibit nuclear export in combination with radiation fractions similar to that given in clinical practice for rectal cancer: hypofractionated short-course radiation dosage of 5 Gy per fraction or the conventional long-course radiation dosage of 1 Gy fractions. Single and combination treatments were tested in colorectal cancer cell lines and xenograft tumor models.

Results: Combination treatment of radiation therapy and Selinexor resulted in an increase of apoptosis and decrease of proliferation compared with single treatment, which correlated with reduced tumor size. We found that the combination promoted nuclear survivin accumulation and subsequent depletion, resulting in increased apoptosis and enhanced radiation antitumoral effects.

Conclusions: Our findings suggest a novel therapeutic option for improving radiation sensitivity in the setting of rectal cancer and provide the scientific rationale to evaluate this combination strategy for clinical trials.

Depth -related distribution of cell surface glycans in normal and pathological human stratum corneum.

Rawad ABDAYEM^{1,2}, Florian FORMANEK¹, Anne Marie MINONDO¹, Anne POTTER¹, Marek HAFTEK²

¹L'Oréal Research and Innovation, Aulnay sous Bois; ²University of Lyon 1, EA4169 "Fundamental, clinical and therapeutic aspects of skin barrier function", Lyon; Actuellement au LBTI, UMR5305 CNRS / UL1, Lyon, France

Résumé : During the stratum corneum (SC) barrier formation, extracellular spaces of viable epidermis, rich in glycans, are filled with an organized lipid matrix whereas plasma membranes of keratinocytes are replaced with cornified lipid envelopes. These latter structures comprise cross-linked trans-membrane glycoproteins and proteoglycans. However, little is known about the presence and distribution of glycans in the SC. In this work, we visualized ultrastructurally and quantified the distribution of glycans on the surface of corneocytes harvested at different SC depths, allowing us to define the relationship between the distribution of various glycans, proteoglycans and glycoproteins, and other changes occurring in the SC. In normal human skin, we found a correlation between the depth -related alterations of corneodesmosome glycoproteins at the cell periphery and α -D-mannosyl and N-acetyl-D-glucosamine labelling patterns. Elimination of the terminal sugars, α -linked fucose and α - (2-3) linked sialic acid, was less abrupt but, also, the initial extent of their peripheral distribution was overall lower than that of concanavalin A and WGA lectin -detected glycans. Diffuse labelling of heparan sulphate glycosaminoglycans disappeared completely from the outermost corneocytes, whereas that of several simple carbohydrates could be detected at all SC levels. This pattern of glycan distribution was also found at the surface of some corneocytes harvested from the SC of patients suffering from atopic dermatitis, despite of an additional abnormal presence of corneocytes entirely covered with glycans in the deep SC. Superficial dandruff corneocytes showed a total absence of cell surface glycans, in contrary to normal scalp corneocytes. Our results suggest that specific glycan distribution may participate in the progressive changes of SC, as it evolves from the SC compactum to the SC disjunctum, towards desquamation.

Caractérisation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique et de la réactivité vasculaire cérébrale par endomicroscopie in vivo associée à des traceurs fluorescents

F-P. Légeron, N. Macrez, B. Bontempi, J-L. Morel.

¹IMN, UMR5293, CNRS-Université de Bordeaux

Résumé: La perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) est considérée comme un des facteurs pouvant accroître la neurodégénérescence. Il existe de nombreux modèles rongeurs de pathologies neurodégénératives pour lesquels le suivi de la porosité de la BHE a été réalisé par des méthodes soit postmortem, soit liées à l'utilisation de traceurs radiomarqués nécessitant alors des équipements spécifiques. De plus, l'hypertension artérielle semble être un facteur de risque majeur de la maladie d'Alzheimer et l'hypotension est rencontrée chez 50% des patients parkinsonien. Il apparait donc que la réactivité des artères cérébrales est un phénomène qui accompagne les pathologies neurodégénératives, en cela un suivi in vivo longitudinal de la réactivité vasculaire est nécessaire pour une meilleure compréhension de la perfusion cérébrale dans les pathologies neurodégénératives. Nous avons développé l'utilisation de l'endomicroscopie in vivo par fibre optique (système cellvizio, MKT) couplé à l'utilisation de traceurs fluorescents pour le suivi de la réactivité et de la perméabilité des vaisseaux cérébraux (artères cérébrales de la pie-mère et capillaires intracérébraux). Pour valider nos protocoles, nous avons comparé différents modèles murins : la souris SAMP8, modèle de vieillissement accéléré présentant une neurodégénérescence précoce et la souris hétérozygote TRPP2 +/- chez qui les mécanismes moléculaires impliqués dans la réactivité vasculaire sont perturbés. Nous avons effectué des mesures de réactivité vasculaire par la mesure des modifications de diamètre artériel après injection de traceurs fluorescents dans la circulation sanguine suivi de l'injection dans la circulation de phényléphrine afin de provoquer une augmentation de pression sanguine. Les fuites des traceurs en dehors du compartiment sanguin en direction du parenchyme cérébral ont permis d'appréhender la perméabilité de la BHE. Les études de perméabilité ont pu être complétées par l'analyse de la diffusion de traceurs de masses moléculaires différentes. Sur ces modèles, les résultats obtenus montrent que (1) les perturbations de la vasoréactivité sont corrélables à des modifications des signaux calciques responsables de la contraction des cellules musculaires lisses et (2) les modifications de perméabilité de la BHE sont présentes dans les modèles de neurodégénérescence et apparaissent au cours du vieillissement.