

Présentation des projets financés au titre de l'édition 2009 du Programme « Interdisciplinaire de Recherche sur les systèmes moléculaires et cellulaires, et d'Innovation Biomédicale (PIRIBio) »

Contenu

ACTIMAG	3
Force associée à la polymérisation d'actine. Aspects biochimiques et mécaniques	
AddX	5
Additifs supramoléculaires de cristallisation des transporteurs ABC de résistance à de multiples agents chimiothérapeutiques	
Adhékines	7
Chimiokines adhésives: structure moléculaire, imagerie cellulaire et outils thérapeutiques	
CALCOMED	10
Calcium carbonate Multifunctional Particles elaborated in supercritical CO2 medium. Application to controlled release of therapeutic proteins for tissue engineering	
CASCADE	12
Microscopie électrochimique à Nanocavité pour l'imagerie fonctionnelle de cascades enzymatiques	
CLICKMASSLINK	15
Pontage covalent « clickable » optimisé pour la spectrométrie de masse, application à l'analyse structurale des pili de type IV de Neisseria meningitidis	
GPCR D-I-F	17
Régulation du fonctionnement des RCPG :hétéro-oligomérisation et organisation dynamique des récepteurs dans la membrane	
HEPAFERON	19
Structure et fonction du complexe IFNg/héparane sulfate pour l'ingénierie d'un glyconjugué de synthèse pour inhiber la cytokine	
ICCR	22
Ion-Channel Coupled Receptors (ICCR):Protein-based bioelectric sensors for the study of G-protein-coupled receptors	
InterGame	24
Molecular and membrane processes in gamete interaction:a biophysical approach	
MASDA-EYE	26
MAss Spectrometry imaging Data Analysis in EYE	
MECHANO-CANCER	28
Induction Mécanique des Gènes Tumoraux dans le Cancer du Colon et dans l'Hepato-Carcinome	
mGluNano	30
Signalisation transmembranaire des récepteurs métabotropiques du glutamate	
MIRR MIRR	32
Microscopie des Intermédiaires de Réplication et Recombinaison	
NanoLife@Work	34
Real-Time Studies of Biological NanoMachines in Action by NMR	

PPIFocusDb	36
Développement et validation d'une chimiothèque focalisée enrichie en inhibiteurs d'interactions protéine-protéine via des approches in silico et in vitro	
Puzzle-fit	38
Intégration de données hétérogènes pour la détermination de la structure de complexes macromoléculaires : application à TFIID	
RETID(Y)NA	40
Real-time protein dynamics in DNA processing enzymes	
ROSETTE	42
Mechanisms of podosomes/invadopodia auto assembly: theoretical and experimental investigations	
STR-ASS-DEF-COL	44
Structures, interactions and interferences in the immediate and long-term protection by innate immune macromolecular complexes	
TODNAL	46
Lésions oxydatives tandem de l'AND, formation réparation et mutagenèse	
VirProbe	48
Conception d'un microsysteme basé sur des sondes électrochimiques ultra-sensibles pour une multi-détection sans marquage d'acides nucléiques: application au génotypage HCV	
Chromodyn	50
Mapping and modelling of chromosome dynamics	
CONE	53
Cellular Orientation in Non-homogeneous Environments	
DynaBiofilm	55
Propriétés physiques locales du biofilm et leur rôle dans la dynamique interne de l'édifice sondé par des micro-colloïdes magnétiques insérés.	
MICEMICO	57
Migration cellulaire en milieu confiné	
Moonlight	59
Predicting MOONLIGHTing proteins from protein-protein interaction networks	
NANOCHEMCELL	61
Chemical Nano-Imaging of the Dopaminergic Cell	
PAGDEG	63
Causes and consequences of protein aggregation in cellular degeneration	
HISTONEDUB	65
Bases moléculaires de la régulation de l'activité de Deubiquitination des histones	
DELTA V	Erreur ! Signet non défini.
Understanding the physical basis for pressure effects on protein folding	

Titre du projet

ACTIMAG

Force associée à la polymérisation d'actine.
Aspects biochimiques et mécaniques.

Résumé

L'évolution dynamique des filaments et des réseaux d'actine est un processus biologique fondamental impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. La propriété fonctionnelle pertinente de l'actine est sa capacité d'autoassemblage via une réaction unique associée à l'hydrolyse de l'ATP. Le couplage de cette réaction à la production de force et son utilisation par la machinerie protéique contrôlant nucléation et croissance des filaments sont encore incompréhensibles du fait de la difficulté expérimentale à maîtriser les paramètres microscopiques.

Ce projet interdisciplinaire combine des approches biochimiques, physiques et théoriques pour caractériser la production de force par la polymérisation de l'actine, à l'échelle de quelques filaments.

Le projet a deux buts spécifiques :

- 1) la détermination de la relation force-vitesse associée à la croissance d'un ou de quelques filaments et de l'influence des protéines accélérant la croissance, telles que le couple profiline/formine qui opère comme des moteurs processifs.
- 2) la compréhension des liens entre la force produite et l'architecture du réseau de filaments, architecture qui peut être contrôlée par la flexibilité des filaments et des points d'ancrage et aussi, par des protéines associées à l'actine produisant des réseaux branchés ou des faisceaux.

Nous mettrons à profit notre expertise en biochimie et sur les colloïdes magnétiques pour développer un nouvel outil expérimental dans lequel des particules colloïdales fonctionnalisées, organisées en réseau unidimensionnel, servent à la fois de points de nucléation et de senseurs de force.

Les résultats préliminaires ont montré la potentialité de cette approche expérimentale. Celle-ci sera couplée à un nouveau cadre de description théorique. Partant de résultats récents de physique statistique sur les systèmes hors d'équilibre, nous étudierons le rôle de l'hydrolyse de l'ATP et les effets collectifs impliqués dans la conversion d'énergie chimique en énergie mécanique.

Enfin, nous pensons que cette nouvelle approche expérimentale permettra d'éclaircir la compréhension de la génération de force par la polymérisation de l'actine.

Partenaires PMMH LEBS

Coordinateur BAUDRY Jean
LIQUIDES IONIQUES ET INTERFACES CHARGÉES

Aide de l'ANR 134160 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0001

Label pôle

Titre du projet

AddX

Additifs supramoléculaires de cristallisation des transporteurs ABC de résistance à de multiples agents chimiothérapeutiques

Résumé

Une approche de "drug-design" d'inhibiteurs hautement efficaces et sélectifs utilisables en thérapie nécessite la connaissance des protéines ciblées au niveau atomique, si possible dans différentes conformations reliées aux différentes étapes catalytiques d'un processus donné. Cette tâche est particulièrement ardue pour les protéines membranaires pour lesquelles l'obtention de structures 3-D représente un défi considérable. Nonobstant cette difficulté inhérente à ce type de protéines, il est indispensable de réussir car elles représentent la cible majeure des molécules thérapeutiques. Parmi elles, les transporteurs ABC ('ATP-Binding Cassette'), qui sont l'objet de ce projet, sont intensément étudiés car ils sont notamment responsables de résistances des cellules cancéreuses aux chimiothérapies. Un point essentiel pour la cristallisation des protéines membranaires est d'augmenter les contacts protéine-protéine qui sont réduits par la présence d'une 'bouée' de détergents entourant la partie transmembranaire. Pour pallier ce problème, nous proposons de développer des outils innovants, basés sur des résultats préliminaires prometteurs et une implication sans relâche (ou "une connaissance approfondie de") dans cette thématique.

Nous développerons une stratégie centrée sur des essais de cristallisation de trois transporteurs ABC impliqués dans la résistance à de multiples drogues, un humain BCRP ('Breast Cancer Resistance Protein') et deux bactériens (BmrA et YheI/YheH), pour lesquels nous avons développé des systèmes d'expression et de purification efficaces. Nous créerons des additifs de cristallisation basés sur (i) des dérivés de calix-arènes (en position 4, 6 ou 8) dont nous avons récemment observé qu'ils favorisent une cristallisation rapide de BmrA, l'une de nos trois protéines cibles, permettant ainsi d'obtenir des cristaux diffractants ; (ii) des saponines et (iii) des chélateurs de lanthanide tel que le tris-dipicolinate. Nous criblerons aussi des chimiothèques de composés modulateurs des transporteurs ABC de multiples drogues, tels que les flavonoïdes. Cette approche est basée sur l'observation que BmrA cristallise en présence de drogues transportées comme la doxorubicine, un agent anticancéreux,

ou la rhodamine. Ceci suggère que ces types de substrats devraient être criblés de manière plus systématique, notamment car nous ne disposons pas à l'heure actuelle de structure avec un substrat fixé dans son site, une telle structure permettant d'aborder plus sereinement une approche future de 'drug design'.

Pour atteindre ces objectifs ambitieux, nous avons besoin de compétences en Biologie, Physique et Chimie, organisées de manière optimale afin d'être le plus efficace possible : nous avons ainsi réunis deux tandem de Biochimiste et Cristallographes, l'un à l'IBCP (Lyon) et l'autre à l'IBS (Grenoble), de manière à optimiser nos recherches, et ces deux axes étant en interaction étroite avec une équipe de Chimistes.

Partenaires IBS IBCP

Coordinateur FALSON Pierre
Institut de biologie et chimie des protéines

Aide de l'ANR 245985 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0002

Label pôle LYON BIOPOLE

Titre du projet

Adhékines

Chimiokines adhésives: structure moléculaire, imagerie cellulaire et outils thérapeutiques

Résumé

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques solubles exprimées par de nombreux types cellulaires. Il y a deux exceptions, CX3CL1 et CXCL16, qui sont produites sous forme membranaire. Ainsi, elles possèdent, avec leurs récepteurs respectifs, le CX3CR1 et le CXCR6, une propriété inattendue de molécules adhésives (d'où leur nom "adhékines"), qui sont impliquées, entre autres, dans la formation des plaques d'athérome et dans certains cancers. Leurs récepteurs sont, comme tous les récepteurs de chimiokines, des Récepteurs Couplés aux Protéines-G (RCPG) de la même classe que la Rhodopsine, pour lesquels le recouvrement ligand-récepteur est faible, et peut donc difficilement expliquer la capacité adhésive des couples CX3CL1/CX3CR1 et CXCL16/CXCR6. Par ailleurs, il semble que le couple CXCL16/CXCR6 n'a qu'une capacité limitée d'adhérence : contrairement au couple CX3CL1/CX3CR1, il ne résiste pas à l'adhésion sous flux. D'où nos questions : Comment un RCPG de la classe de la Rhodopsine et son ligand peuvent posséder une fonction adhésive ? Comment des différences minimales entre ligands (CX3CL1 et CXCL16) peuvent-elles donner une telle variation de fonction adhésive ? Notre projet relève donc clairement de la recherche sur des « bases fondamentales des processus biologiques ». Mais il se prolonge par l'identification de nouveaux composés anti-inflammatoires sur la base d'analogues des chimiokines : il consiste donc aussi en un « développement technologique innovant » et de « l'innovation thérapeutique »

Nos premiers résultats montrent que, de manière surprenante, la chimiokine CX3CL1 est agrégée et probablement oligomérique, contrairement à CXCL16 [Hermand et al. J.Biol.Chem. 2008]. Cela indiquerait qu'une meilleure oligomérisation permettrait une meilleure interface adhésive. Enfin, certains signaux intracellulaires (Gi, RhoA) pourraient dans certains cas augmenter l'adhérence via CX3CR1/CX3CL1 [Daoudi et al. J.Biol.Chem. 2004]. Nous chercherons donc à comparer systématiquement les capacités d'adhérence des couples CX3CL1/CX3CR1 et CXCL16/CXCR6, à visualiser les molécules interactives durant l'adhérence intercellulaire, à trouver les caractéristiques fonctionnelles (agrégation, modification post-traductionnelle, transduction

du signal) et les motifs structuraux (interface monomère/monomère, interaction ligand/récepteur) responsables des différences d'adhésion observées, aussi bien du côté des ligands que du côté des récepteurs. Notre projet comporte ainsi trois volets :

- L'utilisation de la fluorescence avec le BRET et l'HTRF (collaboration avec CisBio International) permet de caractériser les propriétés d'agrégation des chimiokines et de leurs récepteurs aussi bien sur lignées cellulaires que sur cellules primaires. Par mutagenèse dirigée et troncation sélective, nous déterminerons les domaines protéiques responsables de l'oligomérisation observée. Pour mesurer la vitesse de diffusion, à partir de laquelle il est possible d'estimer le degré d'oligomérisation, nous utilisons la technique originale de FRAPP (blanchiment par franges d'interférence) qui est plus précise que le FRAP classique.

- Outre les méthodes classiques (statique, sous flux), nous utilisons une technique originale pour quantifier l'adhérence intercellulaire : le doublet cellulaire est maintenu par deux micropipettes (collaboration UMR CNRS 8550), ce qui permet de mesurer directement la force d'adhésion. Cette technique sera complétée par la microscopie confocale, l'imagerie par homo-FRET et le FRAPP pour visualiser en direct la diffusion des molécules interactives et leur agrégation, avant ou pendant l'adhésion, hors ou dans l'interface adhésive.

- Avec la modélisation moléculaire (collaboration avec l'unité INSERM U 773), et en particulier le « docking », nous analyserons les mécanismes sous-jacents aux déterminants des interactions récepteur/ligand, qui rendent compte de leurs différences fonctionnelles. Cela permettra d'orienter la recherche d'analogues de CXCL16 et CX3CL1 qui auraient des propriétés antagonistes ou « super-agonistes » et pourraient constituer le départ d'une nouvelle pharmacologie fondée sur les chimiokines.

Ce projet interdisciplinaire rassemble des laboratoires dont les collaborations sont déjà effectives. Il concerne un domaine peu étudié, à savoir les mécanismes d'adhérence passant par des chimiokines adhésives impliquées dans la défense anti-tumorale, les maladies cardiovasculaires et certaines maladies neuro-dégénératives. Il développe une technique originale (suivi de l'adhésion, imagerie confocale et homo-FRET, mesure de la diffusion par FRAPP) qui pourrait servir dans d'autres cas d'interaction intercellulaire adhésive. Enfin, il produira des nouveaux anti-inflammatoires qui pourraient avoir des effets spécifiques sur les pathologies vasculaires, tumorales et neuro-dégénératives (DMLA par exemple)

Partenaires LPS

Coordinateur DETERRE Philippe
Immunité et Infections

Aide de l'ANR 375000 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0003

Label pôle

Titre du projet

CALCOMED

Calcium carbonate Multifunctional Particles elaborated in supercritical CO₂ medium. Application to controlled release of therapeutic proteins for tissue engineering

Résumé

Le vieillissement de la population engendre un nombre croissant de cas d'ostéoporose et d'arthropathies dégénératives. L'activité sportive pratiquée par le plus grand nombre est à l'origine de traumatismes articulaires en nombre grandissant. La recherche dans le domaine de l'ingénierie tissulaire est devenue un axe majeur au niveau international. Cette recherche veut répondre à d'importantes questions scientifiques, économiques et sociétales et implique le respect de la réglementation en constante évolution ces dernières années. Des solutions peuvent être apportées dans le domaine des micro-nanomatériaux qui font appel aux compétences des physiciens, des chimistes et des biologistes. Notre consortium offre une approche multidisciplinaire pour la conception de biomatériaux intelligents incluant les protéines thérapeutiques issues des biotechnologies pour l'ingénierie tissulaire des os et cartilages.

Même si les biomatériaux permettent d'apporter des solutions prometteuses au niveau clinique en diminuant le nombre d'actes chirurgicaux, le besoin des cliniciens reste important car les systèmes développés ne répondent pas encore entièrement au cahier des charges pour ce qui est de la résistance mécanique à long terme et de la faculté à régénérer efficacement les tissus visés.

L'objectif de ce projet est de combiner l'utilisation des matrices extracellulaire synthétiques implantables avec de nouveaux systèmes à libération contrôlée encapsulant des facteurs de croissance. Nous formulerons des particules de carbonate de calcium multifonctionnelles (CMP) à l'aide d'un procédé original utilisant le dioxyde de carbone en condition supercritique.

Ce procédé breveté par l'INSERM, permet la fabrication de nano-microparticules de taille contrôlée. Il est basé sur la formation d'une émulsion eau dans CO₂ supercritique où les gouttelettes aqueuses jouent le rôle de micro-nanoréacteur dans lesquels la concentration en substance peut être finement ajustées. La protéine est encapsulée durant la formation des particules ce qui permet d'obtenir des

rendements d'encapsulation élevés (> 70%) pour le lysozyme ou l'insuline avec une activité conservée in vitro. Ces particules peuvent être fonctionnalisées avec des molécules telles que les bisphosphonates connus pour leur forte affinité pour les surfaces minérales. Ceci permettra de moduler les propriétés de surface des particules et donc leur solubilité. Cette fonctionnalisation permet également la chélation de composés d'intérêt thérapeutique ou diagnostic (radionucléides, agents de contraste).

Nous envisageons d'appliquer cette technologie à l'encapsulation de facteurs de croissance (VEGF, TGFbeta) pour lesquels la préformulation est déjà validée par nos équipes. Tout au long du programme, une étude physico-chimique approfondie en milieu pressurisé conduira à une meilleure compréhension du procédé de formulation des CMP.

Nous évaluerons l'impact de ces particules sur les propriétés mécaniques de ciments phosphocalciques et d'hydrogels à base de polymères biocompatibles et sur leur aptitude à libérer de façon contrôlée la protéine dans le but de recruter les cellules impliquées dans la régénération tissulaire des os et cartilages.

La dernière étape de cette étude concerne l'évaluation sur modèle animal, afin de valider une preuve de concept.

Partenaires INSERM LPEC ST

Coordinateur BOURY Frank
INGENIERIE DE LA VECTORISATION PARTICULAIRE

Aide de l'ANR 207921 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0004

Label pôle Atlantic Biothérapies

Titre du projet

CASCADE

Microscopie électrochimique à Nanocavité pour l'imagerie fonctionnelle de cascades enzymatiques.

Résumé

Ce projet propose de développer : (i) un système biomimétique reproduisant les cascades enzymatiques naturelles, en mettant au point une stratégie expérimentale d'assemblage d'enzymes en 2D d'une façon spatialement contrôlé à l'échelle nanométrique. (ii) Une microscopie électrochimique et à force atomique (AFM/SECM) permettant de sonder localement le fonctionnement de ces enzymes, et leurs couplages cinétiques, et ce à une échelle allant de quelques centaines de molécules d'enzymes, à celle de la molécule d'enzyme unique. L'intérêt spécifique de ne s'adresser ainsi qu'à un très petit nombre de molécules d'enzymes est qu'il s'agit là de la seule démarche expérimentale permettant d'établir une corrélation entre l'activité d'une enzyme et la fluctuation (temporelle et d'une molécule à l'autre) de son comportement catalytique. Pour le présent projet, utiliser une technique à sonde locale aura l'avantage de nous permettre de sonder spécifiquement le comportement fonctionnel de groupes d'enzymes en fonction de leur position dans l'assemblage, c'est à dire en fonction de leur couplage diffusiel avec les populations d'enzyme voisines.

Dans les systèmes naturels, l'organisation cellulaire d'enzymes coopératifs en « clusters » supramoléculaires est un élément clef du métabolisme. Un avantage majeur de cette organisation est le transfert d'intermédiaires biosynthétiques entre les sites catalytiques sans diffusion dans le milieu cellulaire. Ce phénomène, appelé « metabolic channeling » est supposé permettre une accélération des vitesses de réaction et un ajustement fin des voies métaboliques. Le premier objectif de ce projet est de vérifier ce modèle expérimentalement en assemblant des complexes enzymatiques artificiels de manière contrôlé. En utilisant la nanolithographie, avec l'aide du LAAS, nous mettrons au point une nanoplateforme permettant un contrôle précis de deux enzymes couplés en une cascade rédox. Dans un premier temps nous espacerons les enzymes de plusieurs centaines de nanomètres, afin de mimer les systèmes enzymatiques naturels dont les réactions sont sous contrôle diffusiel. Dans un second temps, les deux enzymes seront espacés de 10-50 nm de façon à reproduire le phénomène de «

channeling ». Des capsides de virus seront utilisées comme « gabarits » d'assemblage pour contrôler la distribution des enzymes. Puisque l'enzyme en bout de chaîne sera une enzyme rédox, la glucose oxydase, qui accepte une large palette de cofacteurs rédox, l'électrochimie est la technique de choix pour étudier le comportement cinétique de la chaîne enzymatique reconstituée. Aussi proposons nous de développer et d'utiliser pour cette étude, une technique qui nous permettra « d'isoler » de petits domaines enzymatiques sur la surface grâce à une microélectrode creuse. Cette nanoélectrode à cavité sera fabriquée à l'extrémité d'une sonde AFM. La sonde combinée AFM-SECM ainsi produite permettra de localiser les « clusters » d'enzyme sur la surface, mais autorisera aussi la mesure simultanée du courant électrochimique (faradique) associé au fonctionnement rédox de l'enzyme. En utilisant des microélectrodes à nanocavité, d'une taille de 100-500 nm il sera possible de choisir une population d'enzyme et d'en sonder le fonctionnement collectif. Là encore s'agissant d'une technique à sonde locale, la nouvelle microscopie électrochimique à nanocavité nous permettra de « sélectionner » la population d'enzyme à sonder en fonction de son positionnement spatial vis à vis d'autres populations, et donc pour un degré de couplage entre clusters d'enzyme variable. En utilisant des microélectrodes à nanocavité encore plus petites (10 nm) nous serons même en mesure de sonder molécule d'enzyme par molécule d'enzyme. Accéder ainsi au comportement catalytique d'une molécule individuelle présente en soit un grand intérêt puisque l'enzymologie « classique » ne rend compte que du comportement global d'un grand nombre de molécules d'enzymes. Peu d'approches expérimentales permettent d'accéder directement à la dynamique de l'enzyme à l'échelle de la molécule unique, aussi la plus part des données proviennent-elles principalement de simulations de dynamiques moléculaires. Explorer le comportement d'une seule, ou de quelques, biomolécules dans un environnement local complexe est d'un intérêt primordial pour la compréhension de l'efficacité des réactions catalysées par les enzymes et leurs fonctionnement. Une telle approche devrait se révéler très précieuse pour la compréhension fine et « in vivo » des mécanismes enzymatiques complexes.

Partenaires GD2P CPMOH

Coordinateur DEMAILLE Christophe
Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire

Aide de l'ANR 241000 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0005

Label pôle

Titre du projet

CLICKMASSLINK

Pontage covalent « clickable » optimisé pour la spectrométrie de masse, application à l'analyse structurale des pili de type IV de *Neisseria meningitidis*

Résumé

Sonder l'organisation des protéines et de leurs interactions dans un système vivant est indispensable à la compréhension du rôle de ces protéines in vivo. Chez de nombreux pathogènes, dont *N. meningitidis*, la virulence dépend essentiellement de l'expression d'organelles filamenteuses que sont les pilis de type IV. L'élément central de ces pili est une unique protéine de 17 kDa, dite piline majeure, organisée en une structure hélicoïdale formant une fibre flexible et résistante. Différentes conditions cellulaires mènent à des changements d'organisation des pili et à la modulation de la virulence, sans que cette organisation soit connue.

Les techniques usuelles de biologie structurale, comme la cristallographie par rayons X ou la RMN ne peuvent étudier que des complexes purifiés et cristallisables. De ce fait, l'étude de complexes protéiques dans leur état fonctionnel reste un défi. La combinaison entre spectrométrie de masse et pontage covalent, apparue comme prometteuse il y a quelques années, reste très peu utilisée, probablement en raison de l'absence de réactifs réellement spécifiques.

Dans ce projet nous proposons la synthèse d'une nouvelle génération d'agents pontants spécifiquement conçus pour la spectrométrie de masse, dans lesquels un groupe à charge piégée pourra être ajouté par de la chimie « emboîtable » (click chemistry) après pontage in vivo.

Par conséquent le premier objectif de ce projet est la conception et la synthèse d'agents pontants trifonctionnels comportant deux groupes réagissant sur des protéines et une fonction azido. L'ajout d'une charge piégée par « click chemistry » permettra d'augmenter l'efficacité d'ionisation de ces peptides, et comme nous l'avons montré, d'améliorer la couverture de séquence en combinaison avec la dissociation par capture d'électron (ECD). Les avantages majeurs de cette approche par « click-chemistry » sont (i) d'une part de pouvoir mettre au point un seul agent pontant à partir duquel une panoplie de groupes fonctionnels pourront être ajoutés (ii) d'autre part de pouvoir effectuer le marquage au moment le plus propice des différentes étapes de séparation et purification.

La première application de cette méthodologie portera sur l'étude structurale de pilis de type IV de *Neisseria meningitidis*, un complexe de virulence exprimé par ce pathogène bactérien. L'application de notre approche innovante à ces complexes apportera un moyen unique pour l'étude des différents niveaux d'organisation structurale de ce facteur de virulence et en particulier d'en étudier la régulation par l'effet structural de modifications post-traductionnelles.

La pluridisciplinarité est au coeur de ce projet, car il repose sur une collaboration étroite entre des chercheurs dans les domaines de la chimie organique, de la chimie analytique et de la microbiologie appliquée à des problèmes biologiques, en biologie et médecine. Les organiciens apporteront un savoir-faire pour la construction de nouvelles molécules. Les spécialistes de spectrométrie de masse à haute résolution, experts dans les modes de fragmentation utilisant les charges piégées, apporteront la technique ainsi que des connaissances sur les avantages et limitations des techniques de pontage actuelles. Un microbiologiste, spécialisé dans l'étude de pathogènes bactériens apportera les interrogations biologiques sur l'organisation et la structure des facteurs de virulence dans le contexte des pathologies humaines.

Partenaires PARCC COBRA

Coordinateur CHAMOT-ROOKE Julia
Laboratoire des mécanismes réactionnels

Aide de l'ANR 209093 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0006

Label pôle

Titre du projet

GPCR D-I-F

Régulation du fonctionnement des RCPG : hétéro-oligomérisation et organisation dynamique des récepteurs dans la membrane

Résumé

Le mécanisme de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) a été largement révisité, notamment parce qu'il a été montré que les récepteurs pouvaient former des homo- ou des hétéromères. De plus, la notion de RCPGs fonctionnant au sein d'un complexe multiprotéique spécifique ou 'signalosome' a émergé et a été renforcée par l'observation d'une diffusion confinée des RCPGs au sein de microdomaines de la membrane plasmique. Bien que les principaux processus biochimiques régulant l'activité des RCPGs aient été identifiés individuellement, les structures, la dynamique de chaque partenaire et les interactions protéine-protéine successives qui régulent ces événements multimoléculaires restent à déterminer. Le partenariat proposé, qui repose sur la pluridisciplinarité et l'expertise reconnue de biologistes, biophysiciens, chimistes et physiciens, a déjà produit des résultats significatifs dans le domaine des RCPGs et souhaite maintenant étendre encore les connaissances sur ces nouveaux concepts en développant et en appliquant des méthodologies innovantes.

Nous nous concentrerons sur l'interaction entre récepteurs mu opioïde (MOP) et Neuropeptide FF (NPFF2). Le système NPFF est décrit comme régulant les réponses opioïdes afin de maintenir l'homéostasie. Le mécanisme impliqué dans la modulation des réponses opioïdes par le NPFF implique vraisemblablement une interaction fonctionnelle entre récepteurs dans la même cellule plutôt qu'une régulation due à la circuiterie neuronale. Ainsi, le traitement de neurones isolés ou de cellules modèles de neuroblastome humain SH-SY5Y par des agonistes NPFF réduit l'effet inhibiteur des agonistes MOP sur les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants. Grâce à des techniques de fluorescence, nous avons déjà montré dans ce modèle cellulaire que les agonistes NPFF entraînaient l'association des récepteurs MOP et NPFF (observé par transfert d'énergie de fluorescence), mais aussi modifiaient la mobilité latérale du récepteur MOP dans la membrane (observée par retour de fluorescence après photoblanchiment à rayon variable ou vrFRAP). Nous devons maintenant comprendre comment cette interaction entre récepteurs à la membrane peut inhiber la signalisation du

récepteur MOP.

Les objectifs spécifiques du projet sont: 1)L'analyse détaillée par vrFRAP de la régulation des récepteurs MOP et NPFF2 (comportement dynamique et sa régulation par les agonistes et antagonistes, réciprocité et sélectivité de l'interaction). 2)La caractérisation du mécanisme moléculaire impliqué dans la modification de compartimentation du récepteur MOP induite par activation du récepteur NPFF2. 3)L'analyse du lien entre changement de mobilité latérale des récepteurs MOP et réduction de leur capacité à réguler les canaux calciques. 4)La démonstration de ces mécanismes sur des neurones dans lesquels l'effet anti-opioïde du NPFF a déjà été décrit. Plusieurs nouveaux outils et améliorations techniques seront développés afin d'atteindre ces objectifs : 1)un système de FRAP à deux couleurs qui nous permettra de suivre la diffusion des récepteurs NPFF et MOP simultanément, 2)des récepteurs modifiés, notamment fusionnés à la split GFP pour suivre spécifiquement la diffusion des dimères, 3)de nouveaux ligands, fluorescents pour marquer les récepteurs endogènes, et bivalents d'affinité accrue pour les hétéromères afin d'explorer le lien entre diffusion et hétéromérisation.

Ce projet pluridisciplinaire produira des avancées technologiques pour la microscopie par FRAP et la conception d'outils fluorescents. Il permettra aussi d'accroître notre compréhension des mécanismes de 'cross-talk' entre RCPGs, avec l'élaboration de modèles de l'organisation dynamique des complexes de signalisation. En ce qui concerne le cas précis des interactions MOP/NPFF, l'identification de cibles et ligands permettant éventuellement de manipuler spécifiquement la signalisation transmembranaire du complexe fournira des pistes pour améliorer l'usage thérapeutique des opioïdes.

Partenaires LIT IPBS LPT

Coordinateur MOLLEREAU-MANAUTÉ Catherine
Institut de pharmacologie et de biologie structurale

Aide de l'ANR 185268 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0008

Label pôle

Titre du projet

HEPAFERON

Structure et fonction du complexe IFN γ /héparane sulfate pour l'ingénierie d'un glycoconjugué de synthèse pour inhiber la cytokine

Résumé

Les cytokines sont de petites protéines, qui, après avoir été sécrétées, diffusent dans les tissus pour stimuler l'activation, la prolifération, la différenciation des cellules et constituent ainsi un système de communication cellulaire. De nombreux travaux ont démontré que la plupart des cytokines interagissent avec les glycosaminoglycanes, notamment ceux de type héparane sulfates (HS). Ces polysaccharides de grandes tailles sont des constituants ubiquitaires de la surface cellulaire sur laquelle ils sont attachés par le biais de glycoprotéines appelées protéoglycanes. Les HS sont constitués de séquences saccharidiques particulières, en partie définies par leur profil de sulfatation, ce qui leur permet d'interagir avec de nombreuses protéines différentes et d'en réguler la dynamique à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire. Les interactions HS-cytokines permettent de localiser les cytokines dans les tissus, et de contrôler leurs activités biologiques. Etant donnée l'importance des interactions HS-cytokines, dans de nombreux phénomènes biologiques, mais aussi au cours de pathologies, il est indispensable de comprendre les mécanismes et les bases structurales qui permettent ces interactions, ainsi que les fonctions qui y sont associées. Dans ce domaine, les progrès sont rendus particulièrement difficiles par l'extraordinaire complexité structurale des HS, et la caractérisation d'un domaine d'interaction reste particulièrement difficile. Dans ce contexte, nous avons développé une approche basée sur la synthèse chimique de mimés de fragments longs d'HS de façon à identifier ceux présentant une séquence d'intérêt. Cette stratégie a débouché sur la production du premier glycoconjugué mimant le site d'interaction d'une cytokine, l'interféron-gamma (IFN γ), sur les HS. Cette molécule, appelée '2O10', constituée de 2 octasaccharides (dp8) reliés entre eux par un bras de 5 nm a permis de définir l'organisation générale du site de reconnaissance. Elle possède une affinité très importante pour l'IFN γ dont elle inhibe l'interaction avec les HS (mais aussi avec le récepteur cellulaire) avec une IC₅₀ = 35-40 nM. La préparation de ce type de composé et son utilisation thérapeutique ont été brevetés, et constituent un outil puissant pour analyser les

bases structurales permettant la formation du complexe IFN γ /HS, ce qui constitue le but général du présent projet. La molécule 2O10, dont les octasaccharides sont sulfatés de manières homogènes, ne donne pas d'information sur les séquences oligosaccharidiques reconnues par l'IFN γ . Notre hypothèse de travail, récemment validé par des travaux préliminaires, est que seul un nombre restreint (et spécifiques) de sulfates sont engagés dans le mécanisme de reconnaissance. En combinant des approches structurales, chimiques, analytiques et biologiques, notre but est de caractériser au niveau moléculaire la structure du complexe IFN γ /HS, puis d'analyser dans un contexte cellulaire le rôle de l'interaction sur les fonctions biologiques de la cytokine. Ce projet doit permettre de définir la structure oligosaccharidique des octasaccharides interagissant sélectivement avec l'IFN γ . Cet aspect, bien que très important, n'a jamais pu être analysé jusqu'à présent, à cause de la trop grande hétérogénéité des HS naturels, mais devient possible en utilisant des mimes de synthèse. Le glycoconjugué 2O10 peut, en effet, être produit de façon homogène et en quantité importante et suffisante pour des études structurales (diffraction des rayons-X et RMN) ainsi qu'in cellulo. De plus, des chimiothèques synthétiques, ou purifiées de sources naturelles, de fragments octasaccharidiques d'HS permettront de préciser les motifs de sulfatation conduisant à une plus grande affinité et spécificité d'interaction. L'augmentation des connaissances dans les domaines de la biologie de l'IFN γ et de la structure du complexe HS-IFN γ nous permettra d'optimiser la molécule '2O10' comme inhibiteur de cette cytokine. Cette nouvelle approche thérapeutique, dans laquelle une « petite drogue glycanique » serait utilisée pour la première fois pour inhiber l'activité d'une cytokine, devra ensuite être testée dans un modèle animal dans le cadre de futures demande de financement. Le présent projet résulte d'une collaboration à long terme entre les partenaires 1 (glycobiologiste) et 2 (chimiste organicien), dans le domaine des interactions IFN γ /HS et, couplé aux approches analytiques développées en spectrométrie de masse par le partenaire 3, représente une étape supplémentaire vers la caractérisation structurale et fonctionnelle de ce complexe. La mise en commun du savoir faire très spécifique des trois partenaires est particulièrement innovante et devrait permettre de franchir des étapes technologiques et scientifiques clés de ce champ disciplinaire.

Partenaires ICMMO LAMBE

Coordinateur LORTAT-JACOB Hugues
Institut de biologie structurale

Aide de l'ANR 239104 k€

Durée 48 mois

Référence ANR-09-PIRI-0009

Label pôle

Titre du projet

ICCR

Ion-Channel Coupled Receptors (ICCR): Protein-based bioelectric sensors for the study of G-protein-coupled receptors

Résumé

A l'aide de protéines existantes, il est possible de créer des objets biologiques possédant de nouvelles propriétés. Notre publication récente (Moreau et al., 2008, Nature Nanotech. 3:620-625) a présenté le concept de Récepteurs Couplés à un Canal Ionique (Ion-Channel Coupled Receptors ou ICCR), qui consistent en des protéines hybrides construites par l'assemblage d'un canal ionique et d'un récepteur de telle sorte que le canal serve de rapporteur électrique de la fonction du récepteur associé. Ce concept d'ICCR, imaginé et développé sur plusieurs années, est totalement nouveau et recèle de nombreuses potentialités, du plus fondamental ' l'étude des interactions entre protéines membranaires, de la dynamique des récepteurs, et du mécanisme du gating des canaux ' au plus appliqué ' la création de biocapteurs nanoélectroniques pour le criblage, le diagnostic, et la biodétection. Cependant, un travail considérable reste à faire pour exploiter le potentiel de cette technologie.

Nous avons jusqu'à présent construit des ICCR en élaborant des protéines de fusion entre le canal potassique Kir6.2 et deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) prototypiques. Nous proposons de poursuivre le projet dans deux directions: 1) Rester focalisé sur les ICCR existants basés sur les récepteurs muscarinique M2 and dopaminergique D2 et le canal Kir6.2, et combiner ingénierie protéique, études fonctionnelles, et modélisation moléculaire pour mieux comprendre le processus moléculaire de couplage entre les deux partenaires au sein d'un ICCR, 2) Développer de nouveaux ICCR avec plusieurs RCPG d'intérêt, dont le récepteur β 2-adrénergique et les récepteurs de chimiokines ' et corécepteurs du HIV -- CCR5 et CXCR4.

Ce projet reste donc très fondamental. Il ne porte pas sur le développement d'applications commerciales potentielles qui demanderait des ressources en temps et personnel d'une toute autre échelle.

Les objectifs du projet nécessitent l'utilisation combinée de techniques innovantes: biologie moléculaire (pour construire les ICCR), biophysique (pour caractériser fonctionnellement les ICCR), physique théorique (pour modéliser les ICCR) et informatique (pour développer les outils de modélisation

appropriés). Ce dernier aspect implique l'utilisation d'algorithmes originaux permettant une manipulation interactive en temps réel de complexes protéiques de grande taille.

Le projet rassemblera quatre équipes complémentaires spécialisées dans l'ingénierie des protéines et la biophysique (Michel Vivaudou; Groupe Transporteurs, Récepteurs, et Canaux Ioniques; IBS Grenoble), la biologie moléculaire et la biochimie des protéines membranaires et RCPG (Franck Fieschi; Groupe Membrane et Immunité; IBS Grenoble), la modélisation et la dynamique moléculaire des protéines membranaires (Serge Crouzy; Groupe Modélisation, Interactions, et Repliement; CEA Grenoble), et le développement de logiciels pour la modélisation moléculaire (Stéphane Redon; Equipe Nano-D ; INRIA Rhône-Alpes).

Le travail proposé remplit le critère d'interdisciplinarité de l'appel d'offres PiriBio en rassemblant des biophysiciens, biochimistes, bioinformaticiens, et informaticiens, pour affronter les problèmes d'interactions et de dynamique des protéines membranaires. Il rentre dans le cadre de plusieurs axes thématiques de l'appel d'offres, notamment les bases structurales du vivant, les nouvelles approches diagnostiques, les développements technologiques innovants en nanosciences, et la modélisation de macromolécules.

Partenaires IBS CRI Grenoble R Alpes LCBM

Coordinateur VIVAUDOU Michel
Institut de biologie structurale

Aide de l'ANR 311439 k€

Durée 48 mois

Référence ANR-09-PIRI-0010

Label pôle

Titre du projet

InterGame

Molecular and membrane processes in gamete interaction : a biophysical approach

Résumé

Malgré la baisse actuelle de la fertilité humaine, la recherche visant à comprendre le processus de fécondation est peu développée. Les mécanismes moléculaires et membranaires impliqués dans ce processus sont mal compris en partie parce que les approches biologiques classiques sont difficilement adaptables aux cellules gamétiques. En effet, les ovocytes présents en nombre limité rendent délicate la mise en oeuvre de techniques quantitatives qui permettraient de décrire quelles protéines et comment ces protéines assurent l'adhésion puis la fusion des membranes gamétiques. De ce fait, il est nécessaire de développer de nouvelles approches qui permettraient une description précise du processus de fécondation. Le présent projet propose d'utiliser des outils biophysiques permettant une mesure quantitative de forces intercellulaires et intermoléculaires à très petite échelle ainsi que des coefficients de diffusion moléculaires; ceci afin d'obtenir une description fiable du processus d'interaction gamétique murin. Trois équipes sont impliquées: une équipe de médecins biologistes, une de biophysiciens et une de biologistes. L'équipe de médecins biologistes a récemment mis en évidence l'existence d'un échange de fragments membranaires entre l'ovocyte et le spermatozoïde avant la fusion; elle présente, par ailleurs une pratique étendue de la médecine de la reproduction. L'équipe de biophysiciens a développé un dispositif unique conçu pour mesurer (i) des forces de rupture de liens simples, (ii) une adhésion entre cellules vivantes, (iii) des énergies d'assemblage entre un ligand et son récepteur et (iv) des coefficients de diffusion de protéines membranaires. L'équipe de biologistes est un spécialiste mondial des tétraspanines, molécules cruciales dans le processus de fusion gamétique; ils ont une connaissance approfondie de la biologie des membranes et une expertise étendue dans l'obtention de molécules de synthèse ou de souris génétiquement modifiées. Ce projet a pour but de caractériser le rôle des molécules impliquées dans l'adhésion et la fusion des gamètes et de quantifier les interactions qu'elles induisent à l'échelle d'une molécule ou de toute une membrane. Il poursuit également le but de décrire précisément le transfert de fragments membranaires entre l'ovocyte et le spermatozoïde ainsi que son rôle dans la fusion

et également d'élucider la question de l'implication de la réorganisation de la membrane ovocytaire dans la fusion. Tout ceci avec l'objectif ultime de déterminer l'orchestration des différentes étapes du processus de fusion. Pour cette étude, un nouveau système combinant en un seul et unique dispositif, mesure de force par micropipettes, imagerie 3D et FRAPP, sera développé. L'étude nécessitera également l'utilisation de gamètes génétiquement modifiés et de protéines recombinantes pour la mesure de forces entre un ovocyte et des billes de verre fonctionnalisées ou bien entre deux gamètes; et également pour l'observation de la réorganisation membranaire et du transfert de fragments membranaires. L'équipe de biophysiciens a récemment démontré que sa technique de mesure de forces permettait d'analyser l'adhésion des membranes gamétiques d'une manière suffisamment détaillée pour permettre la mise en évidence de différences subtiles mais cruciales liées à l'invalidation du gène de la tétraspanine CD9. En décrivant les étapes clés de la fusion des membranes gamétiques, ce projet vise à améliorer les méthodes de diagnostic d'infertilité, à améliorer les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation et à développer de nouvelles méthodes contraceptives.

Partenaires INSTITUT COCHIN

Coordinateur PEREZ Eric
Laboratoire de physique statistique de l'ENS

Aide de l'ANR 201204 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0011

Label pôle

Titre du projet

MASDA-EYE

MAss Spectrometry imaging Data Analysis in EYE

Résumé

L'imagerie par spectrométrie de masse (ISM) est une technologie émergente qui permet d'accéder avec une grande sensibilité et un haut débit à la complexité moléculaire du tissu sain ou malade. Comparée à l'immunocytochimie classique, souvent limitée par la spécificité des anticorps et le nombre d'antigènes différents qu'il est possible de détecter simultanément, l'ISM fournit la masse de centaines de biomolécules et de métabolites en une seule fois, sans nécessiter de connaissance a priori sur la cible recherchée. L'ISM est devenue ces dernières années une technologie majeure pour de nombreuses applications biologiques et cliniques, dont la découverte de biomarqueurs présentant une distribution spatiale d'intérêt dans les maladies neurodégénératives ou les dystrophies musculaires, l'étude de la biodistribution des médicaments et de leurs métabolites, la microbiologie et la classification de biopsies tumorales.

La désorption laser assistée par matrice (MALDI) et le bombardement par des ions rapides (SIMS) sont deux techniques majeures permettant la désorption et l'ionisation des molécules avant leur analyse par temps de vol (TOF). Les images obtenues par ces technologies sont complémentaires, aussi bien du point de vue de la gamme de masse et donc de la classe des biomolécules analysées (peptides/protéines, métabolites, lipides) que de la résolution spatiale (de 50 jusqu'à 0.4 μm). Alors que les approches MALDI-TOF et TOF-SIMS ont été majoritairement utilisées séparément pour l'ISM jusqu'ici, notre projet vise à tirer parti de leur complémentarité pour utiliser les deux technologies en parallèle, avec les appareils respectifs les plus performants, et fusionner les données.

En plus du défi technologique qu'il représente, l'objectif de combiner les deux modalités d'imagerie est fortement conditionné par le développement d'algorithmes performants et de modules logiciels associés pour l'acquisition des données (les images ont une taille de plusieurs Go et des formats spécifiques selon les instruments), leur traitement (soustraction du bruit de fond, calibration en masse) et leur interprétation (clustering hiérarchique, séparation de sources en aveugle sous contrainte de positivité). En particulier, la conception d'outils bioinformatiques innovants pour l'identification de marqueurs est essentielle pour l'ISM : d'une

part, l'identification des protéines est aujourd'hui limitée en raison de la complexité des mélanges de signaux et d'autre part, les bases de données massives des lipides et des métabolites commencent seulement à faire leur apparition. Comme preuve de principe, nous validerons cette approche dans le contexte biomédical de l'ophtalmologie. Le glaucome est une maladie oculaire grave conduisant à la perte de la vision et nécessitant un traitement à vie. Durant les 15 dernières années, de nombreuses études ont montré la toxicité de conservateurs tels que le chlorure de benzalkonium (BAC) contenu dans les collyres anti-glaucome. L'objectif biologique du projet est d'étudier la distribution spatiale du BAC et de caractériser les conséquences physiopathologiques de sa toxicité (apoptose, stress oxydant, processus inflammatoire) chez le lapin puis chez l'homme. Notre approche pour combiner les modalités d'imagerie MALDI-TOF et TOF-SIMS grâce à des modules logiciels optimisés, et sa validation à l'étude de la pharmacotoxicologie oculaire ouvre la voie vers l'"histolomique", i.e. l'histologie moléculaire à haut débit intégrant plusieurs modalités d'imagerie complémentaires.

Partenaires IDV CNRS CNRS

Coordinateur Both Jean-Pierre
Laboratoire d'Intégration des Systèmes et des Technologies (CEA)

Aide de l'ANR 243409 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0012

Label pôle

Titre du projet

MECHANO-CANCER

Induction Mécanique des Gènes Tumoraux dans le Cancer du Colon et dans l'Hepato-Carcinome

Résumé

Notre appréhension de la morphogenèse et de l'homéostasie des tissus multi-cellulaires est actuellement réactualisée par un nombre croissant d'évidences montrant l'implication d'une interaction réciproque « mécano-sensible » entre l'état mécanique du tissu et l'état d'expression du génome. Bien que l'existence de tels signaux mécaniques ait été découverte comme étant impliquée de façon critique dans le développement embryonnaire in vivo, ainsi que durant l'organogenèse, la plus part des études expérimentales s'étant focalisées sur les processus de croissance tumorale ont été effectuées sur des systèmes reconstitués (en culture cellulaire), en manipulant la rigidité du substrat ou de la matrice extracellulaire. Nous avons récemment découvert que des tissus pré-tumoraux APC de colon de souris (Adenomatous Polyposis Coli protéine, souris portant un allèle mutant : APC1638N+/-) sont spécifiquement sensibles à des déformations mécaniques qui miment la pression de transit intestinal, entraînant l'activation de la voie Wnt/beta-catenin et menant à l'expression des oncogenes cibles c-myc et twist-1. Or, la majorité des cancers du colon relèvent de mutations APC.

Nous proposons ici de tester in vivo l'implication de telles expressions géniques en réponse à la pressions générées par le transit intestinal sur le tissu pré-tumoral, mais aussi développées de façon endogène par la croissance tumorale sur le tissu pré-tumoral environnant la tumeur. Nous disséquons les éléments moléculaires clefs du processus de mécano-transduction, afin de développer les stratégies pharmacologiques et moléculaires permettant d'inhiber les processus de mécano-transduction potentiellement impliqués dans l'initiation ou l'amplification de la croissance tumorale. Cette approche sera de même appliquée au cancer du foie, un cancer majeur dans le monde occidental, impliquant de plus un organe-site majeur de métastases dérivant du cancer du colon, et dans lequel la voie Wnt/beta-catenin est aussi activée de façon corrélée au processus de progression tumorale.

De plus, nous évaluerons la possibilité que les contraintes mécaniques puissent amplifier la probabilité de perdre le second allèle d'APC en réponses aux contraintes développées

sur le tissu APC+/- muté. Ceci est suggéré par le fait que les cellules mutées pour une copie d'APC, subissant déjà des défauts mécaniques dans la ségrégation de chromosomes associés aux effets dominants de la troncation de la molécule APC durant la mitose, pourraient être soumis à une probabilité accrue de perte d'hétérozygotie entraînant la perte de second allèle d'APC par perturbation mécanique de la cellule.

Ce projet de recherche, fondamentalement interdisciplinaire, requiert le développement de nouvelles approches physiques et technologiques expérimentales nous permettant de mimer localement des pressions pulsées récurrentes (transit intestinal) ou continues (croissance tumorale) in vivo, sur la base de manipulations magnétiques de ferro-fluides introduits localement dans les cellules ou le tissu. Les outils d'optique non-linéaire de dernière génération seront utilisés pour observer les tissus, les cellules et les déformations sub-cellulaires dans le tissu vivant non-marqué, ainsi que pour mesurer la pression associée à la croissance tumorale. Ces technologies physiques seront couplées de façon étroite aux technologies de biologie moléculaire et de génétique utilisées dans les études biologiques pré-cliniques de la progression tumorale dans le colon et le foie chez la souris. Ainsi qu'avec les approches pharmacologiques permettant de cibler les éléments clefs des voies de transduction du signal impliqués dans nos études pré-cliniques, dans une perspective clinique de traitement.

Partenaires CDC L.O.B.

Coordinateur FARGE Emmanuel
Unite physico-chimie Curie

Aide de l'ANR 150006 k€

Durée 48 mois

Référence ANR-09-PIRI-0013

Label pôle

Titre du projet

mGluNano

Signalisation transmembranaire des récepteurs métabotropiques du glutamate

Résumé

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) appartiennent à la Classe C des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ils sont activés par le glutamate, le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Les 8 récepteurs mGlu (mGluR1 à mGluR8) sont exprimés dans des régions différentes du cerveau, et ils constituent des cibles pharmacologiques pour le traitement de différents troubles neurologiques et psychiatriques (épilepsie d'absence, anxiété, dépression, migraine, spasmes, maladie de Parkinson et douleur).

Les mGluR sont des homodimères allostériques à multiples domaines composés d'un domaine Vénus flytrap (VFT) qui lie les agonistes orthostériques tel que le glutamate, et les antagonistes compétitifs, et d'un domaine à sept hélices transmembranaires (7TM) commun à tous les GPCR et responsable de l'activation de la protéine G. De façon intéressante, des modulateurs allostériques (AM) positifs peuvent agir directement dans les 7TM pour moduler l'activation des mGluRs. Ces molécules sont sensés être de meilleures drogues que les agonistes classiques puisqu'elles potentialisent l'activité du récepteur uniquement quand et où l'agoniste naturel est présent. Les régulateurs allostériques négatifs bloquent l'activation des protéines G par le récepteur.

Un défi majeur dans la pharmacologie des mGluR est de comprendre les bases moléculaires de ces AM, et d'étudier comment les changements de conformations des 7TM sont responsables de l'activation de la protéine G. L'objectif de notre projet est de cartographier les changements conformationnels dans les 7TM induits par un AM positif ou négatif en utilisant une combinaison de techniques biochimiques et biophysiques. Nous proposons pour la première fois : (i) de purifier les 7TM des mGluR ; (ii) de reconstituer les 7TM purifiés comme monomères ou dimères dans des nanodiscs phospholipidiques ; (iii) de marquer ces monomères et dimères à des sites spécifiques à l'aide de trois fluorophores différents et compatibles avec des mesures de FRET en temps résolu ; (iv) de déterminer les changements conformationnels dans les 7TM induits par la liaison des ligands. Nous utiliserons les récepteurs mGluR2 et mGluR5 comme modèles.

Les nanodiscs (diamètre de 100 Å) miment l'environnement naturel des récepteurs, et ils permettent de contrôler strictement la stoechiométrie des 7TM, un ou deux monomères par nanodiscs. Nos résultats préliminaires montrent que les 7TM purifiés de mGluR2 reconstitués dans des nanodiscs sous forme de monomères ou de dimères, activent efficacement la protéine G.

Pour cartographier dans les nanodiscs les changements conformationnels induits par les AM et de l'ordre de l'Ångström, nous développerons une approche innovante de double FRET en temps résolu basé sur le marquage orthogonal avec trois fluorophores compatibles avec le FRET en temps résolu (cryptate de terbium comme donneur, et fluorescéine et Alexa647 comme accepteurs).

Ce projet sera développé par trois partenaires : Drs P. Rondard et S. Granier (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) pour la purification des 7TM, la biochimie et l'analyse biophysique ; Dr. JL Banères (Montpellier) pour le développement des nanodiscs et l'analyse biophysique ; CisBio pour le développement d'outils chimiques pour le FRET. En résumé, ce projet interdisciplinaire nécessite des expertises en chimie, photophysique, biochimie et biophysique. Nous espérons obtenir une vision structurale des bases moléculaires de l'activation des 7TM de mGluRs. Ces résultats devraient permettre le développement de meilleurs modulateurs allostériques par une conception rationnelle de drogues basée sur des données structurales.

Partenaires IBMM

Coordinateur RONDARD Philippe
Institut de génomique fonctionnelle

Aide de l'ANR 368946 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0014

Label pôle

Titre du projet

MIRR

Microscopie des Intermédiaires de Réplication et Recombinaison

Résumé

Au cours de la synthèse d'ADN, la progression des fourches de réplication peut être compromise par des barrières de réplication (RFBs) qui résultent de situations variées (dommages de l'ADN, présences de complexes protéines/ADN, structures secondaires de l'ADN). Selon la nature du blocage, de nombreux mécanismes sont employés pour assurer la reprise de la synthèse d'ADN : la recombinaison homologue, le changement de matrice et la synthèse au travers de la lésion (TLS). Un défaut dans ces mécanismes peut résulter en une incapacité à reprendre correctement la synthèse d'ADN et en une instabilité génétique. Bien que de nombreux facteurs soient impliqués dans le redémarrage ou la protection de fourches bloquées, leurs rôles précis dans le contournement ou l'élimination du blocage restent mal connus. De plus, la recombinaison homologue peut dans certains cas être délétère au cours de la réplication, et des mécanismes spécifiques existent afin d'éliminer des intermédiaires de recombinaison toxiques pour la cellule. Pour comprendre ces mécanismes, nous souhaitons développer de nouvelles méthodologies afin de visualiser et de caractériser (au niveau quantitatif et qualitatif) des intermédiaires de réplication et de recombinaison formés à la fois in vivo et in vitro. Il apparaît aujourd'hui que seule l'imagerie moléculaire peut permettre une caractérisation fine et précise des structures d'ADN de ces intermédiaires. De telles approches interdisciplinaires peuvent uniquement être réalisées en réunissant des laboratoires de biologie disposant de systèmes modèles élégants et de techniques d'imagerie permettant de plonger au cœur des caractéristiques physiques de la structure de l'ADN. Nous proposons donc d'associer des techniques poussées de biologie moléculaire (tels que les gels bidimensionnels et le peignage de l'ADN), de biochimie avec une imagerie moléculaire performante telle que la microscopie électronique, l'AFM et la microscopie optique à fluorescence. Le développement de nouveaux outils issus de techniques d'imagerie moléculaire pour étudier et caractériser des intermédiaires de réplication et de recombinaison au niveau moléculaire est au cœur de ce projet. Notre projet vise à l'émergence de nouveaux concepts biologiques relatifs à la réplication et la recombinaison de l'ADN et aux

développements de nouvelles approches afin d'explorer l'ADN de nombreux organismes.

Partenaires LRD

Coordinateur LE CAM Eric
Interactions moléculaires et cancer

Aide de l'ANR 156000 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0015

Label pôle

Titre du projet

NanoLife@Work

Real-Time Studies of Biological NanoMachines in Action by NMR

Résumé

L'étude fonctionnelle et structurale des machines macromoléculaires est une tâche difficile compte tenu de la dimension des objets étudiés, de leur flexibilité et de la complexité des substrats manipulés (protéines, peptides, ADN, ARN). Ces études nécessitent la combinaison de la cristallographie aux rayons X et de méthodes « basse » résolution : SAXS, SANS, cryomicroscopie électronique. Ces méthodes apportent seulement une vue 'figée' et fournissent que trop rarement les données cinétiques nécessaires pour comprendre, au niveau atomique, le mode d'action de ces nano-objets. Dans ce projet, des techniques de pointes en spectroscopie RMN, marquage isotopique, chimie organique, biologie moléculaire robotisée et enzymologie des complexes protéiques hyperthermophiles, seront utilisées en synergie pour étudier hors d'équilibre ces assemblages, de tailles bien supérieures aux limites de la RMN biomoléculaire classique. Le développement récent par le porteur du projet, de méthodes permettant l'enregistrement en moins d'une seconde d'expériences RMN 2D haute résolution pour des protéines de plusieurs centaines de kilo Dalton, ouvre la possibilité de suivre en temps réel l'auto-assemblage, de détecter des états d'oligomérisation transitoires ou d'identifier des états d'assemblages non natif pour ces nanoparticules biologiques. De plus, en combinant ces outils innovants, avec les propriétés de thermo-activation des assemblages biologiques hyperthermophiles, le consortium sera dans une position très favorable pour observer, en temps réel et avec une résolution atomique, des Nanomachines biologiques de grandes tailles en pleine action. L'utilisation de l'ensemble de ces outils permettra de caractériser les réarrangements fonctionnels important dans des assemblages solubles de grandes tailles impliqués dans le contrôle qualité des protéines (Chaperones, protéasomes, exo-peptidases,). Les techniques développées nous apporteront des informations structurales et cinétiques, sur la reconnaissance du substrat, le trafic du substrat au coeur de la particule, la catalyse et la libération des produits.

Partenaires IBS IBS LCBM

Coordinateur BOISBOUVIER Jerome
Institut de biologie structurale

Aide de l'ANR 247235 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0016

Label pôle

Titre du projet

PPIFocusDb

Développement et validation d'une chimiothèque focalisée enrichie en inhibiteurs d'interactions protéine-protéine via des approches in silico et in vitro

Résumé

Les interactions protéine-protéine (PPIs) sont essentielles à la plupart des processus cellulaires. Les PPIs aberrantes sont responsables de la plupart de maladies recensées et font donc de ce type de système une classe de cibles encore peu explorée mais ayant un fort potentiel pour l'innovation thérapeutique. On estime que le nombre de PPIs dans le corps humain avoisine les 650,000 interactions, pour la plupart encore inconnues. Ce nombre illustre la magnitude du chantier qui devra être entrepris pour innover notamment par ce que ce type d'investigation devra être aussi réalisé pour les autres organismes. Globalement, ces 30 dernières années, les principaux inhibiteurs d'interactions protéine-protéine développés étaient des anticorps et des peptides. Une autre approche serait de développer des petites molécules « drug-like », mais ceci reste toujours une aventure complexe, très couteuse, et comprenant de multiples problèmes techniques. Néanmoins, des études récentes, à la fois dans les secteurs académique et industriel ont montré que le développement d'inhibiteurs « drug-like » pour les PPIs est possible.

Plusieurs questions se posent: Comment étudier ces PPIs de manières plus efficaces ? Comment rapidement réaliser une preuve de concept sur la « druggabilité » de milliers de PPIs ? Est-il possible de définir un espace chimique spécifique aux inhibiteurs PPIs sachant qu'il est apparemment différent de celui des composés interagissant avec les sites catalytiques ou les récepteurs membranaires ? Aujourd'hui, les approches les plus efficaces pour identifier des inhibiteurs PPI « drug-like » sont le criblage expérimental à haut débit, le criblage de fragments chimiques et le criblage virtuel. Cependant, ces approches peuvent aussi être très couteuses, et pas toujours efficaces sur le cas spécifique des PPI et ne permettent pas de rationaliser l'espace chimique des inhibiteurs PPI pour de futurs projets. Dans la plupart des cas, les chimiothèques criblées n'ont pas été préparées pour être utilisées pour bloquer les PPIs et sont les mêmes que celles utilisées sur des systèmes classiques (sites catalytiques ou récepteurs membranaires). Nous pensons que l'une des solutions à ce vaste puzzle est le design d'une chimiothèque focalisée

enrichie en inhibiteurs PPI potentiels. Cette petite chimiothèque pourrait être utilisée en priorité pour tous les criblages expérimentaux et les preuves de concepts au préalable à des études plus couteuses. Nous avons déjà développé la version beta d'un logiciel capable d'enrichir une chimiothèque en inhibiteurs PPI à travers la combinaison d'approches chemoinformatique et de méthodes d'apprentissage. Nous avons testé les performances de notre outil via un criblage HTS expérimentale du système PPI p53/MDM2. Nous souhaiterions maintenant optimiser nos modèles mathématiques et analyser l'espace chimique associé aux inhibiteurs PPIs. Nous voudrions ensuite valider notre outil à plus grande échelle au travers du criblage expérimental de deux chimiothèques sur 4 systèmes PPIs bien référencés, l'une issue de notre filtre informatique et l'autre venant d'une sélection aléatoire. En parallèle de ces campagnes de criblage, nous envisageons une validation par cristallographie aux rayons X des modes de liaison de certains inhibiteurs identifiés par criblage. Au terme de notre projet, nous devrions être capable de fournir a) un logiciel permettant de filtrer les chimiothèques pour les enrichir en inhibiteurs PPIs, b) une chimiothèque focalisée enrichie en inhibiteurs PPIs prête au criblage expérimental à haut débit, et c) une description d'une partie de l'espace chimique des inhibiteurs PPI. Ce projet implique des experts travaillant en chemoinformatique, des chimistes médicaux, des biologistes structuraux, des biologistes moléculaires et des cliniciens. A notre connaissance, il n'existe pas de logiciel pouvant effectuer un filtrage de chimiothèques ni de chimiothèques focalisées commerciales ou libres enrichies en inhibiteurs PPI. Ces deux « outils » ont une valeur commerciale indéniable, ils seront en revanche distribués gratuitement (logiciel et version numérique de la chimiothèque) sur requête auprès des groupes de recherche impliqués dans le projet.

Partenaires INSERM CNRS

Coordinateur Villoutreix Bruno
U973

Aide de l'ANR 163904 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0017

Label pôle

Titre du projet

Puzzle-fit

Intégration de données hétérogènes pour la détermination de la structure de complexes macromoléculaires : application à TFIID.

Résumé

L'objectif du projet est de développer des outils bioinformatiques pour intégrer des données expérimentales et bioinformatiques hétérogènes dans la reconstruction tridimensionnelle de complexes multi-protéiques. Le projet est centré sur le facteur de transcription TFIID comme paradigme d'un assemblage multiprotéique complexe composé de modules interchangeables. Les outils développés dans le cadre de ce projet seront cependant suffisamment généraux pour être adaptés à l'étude de divers complexes multiprotéiques.

TFIID est composé de la protéine de liaison à la TATA-box (TBP) et de 14 protéines conservées appelées protéines associées à TBP ou TAFs. TFIID est impliqué dans plusieurs pathologies par ses propriétés de liaison à plusieurs activateurs/répresseurs de la transcription ou par l'activité histone acetyl transférase (HAT) de sa sous-unité TAF1. Plusieurs groupes à l'IGBMC ont contribué à la caractérisation fonctionnelle de TFIID au niveau cellulaire et moléculaire, et des travaux récents sur l'inactivation des TAFs dans des souris transgéniques ont éclairé leur fonction dans le développement et la différenciation tissulaire. Plusieurs questions essentielles sur les mécanismes moléculaires de l'action de TFIID restent cependant encore sans réponse et une meilleure compréhension de son organisation spatiale est essentielle dans cette perspective.

TFIID constitue un exemple représentatif d'un complexe macromoléculaire pour lequel de nombreuses données structurales, biophysiques et fonctionnelles sont disponibles, mais où des informations cruciales sur l'organisation spatiale sont encore manquantes et freinent l'exploitation de l'ensemble des données déjà amassées. La motivation principale de notre projet est l'observation qu'un large ensemble de données biochimiques, génétiques et biophysiques peuvent être converties en contraintes spatiales et permettre de résoudre les ambiguïtés structurales. L'objectif du projet est d'intégrer ces données bioinformatiques, biophysiques et structurales pour élucider l'architecture de TFIID avec la meilleure résolution possible. Nous proposons une stratégie multidisciplinaire qui comprend

la bioinformatique structurale, la génomique, les mathématiques appliquées et la biologie structurale expérimentale. L'objectif sera d'utiliser des méthodes avancées de simulation moléculaire pour assembler TFIID à partir de ses composants, d'une manière cohérente avec l'ensemble des données disponibles sur la structure et les interactions au sein du complexe. Un objectif majeur de Puzzle-fit sera de développer et valider des protocoles permettant d'intégrer les données résultant de la fouille de données d'interactomique dans le processus de reconstruction et de valider les modèles résultants.

Cette approche multidisciplinaire sera implémentée par le partenariat entre A. Dejaegere (simulations moléculaires et bioinformatique structurale), O. Lecompte (génomique comparative), N. Wicker (statistique et mathématiques appliquées) et P. Schultz (microscopie électronique et études structure/fonction de TFIID).

Notre projet apportera des éléments originaux sur les mécanismes moléculaires de l'initiation de la transcription chez les eucaryotes, dans lequel TFIID joue un rôle majeur et apportera des informations nouvelles sur la dérégulation de la transcription dans les processus pathologiques

Du point de vue méthodologique, notre projet mènera au développement de nouveaux outils bioinformatiques et statistiques pour simuler l'assemblage de complexes. Nous aurons accès à IMP et à son code source. IMP est une suite de programmes développés dans le laboratoire d'A. Sali (UCSF, USA) spécifiquement dans le but de générer la structure d'assemblages supramoléculaires à partir de données hétérogènes. Les développements méthodologiques seront rendu compatibles avec cet environnement informatique de manière à en assurer la plus large diffusion et seront d'un intérêt général pour l'assemblage de complexes.

Partenaires INSERM INSERM

Coordinateur DEJAEGERE Annick
UMR 7104 / UMR_S 596 INSTITUT DE GENETIQUE ET DE
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Aide de l'ANR 170000 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0018

Label pôle Innovations thérapeutiques

Titre du projet

RETID(Y)NA

Real-time protein dynamics in DNA processing enzymes

Résumé

Les changements de conformation de protéines jouent un rôle vital dans les processus biochimiques. Ils peuvent varier de mouvements locaux de faible amplitude pendant le transfert d'électron à des mouvements de domaine très étendus souvent rencontrés dans la catalyse enzymatique. Dans ce projet, des mouvements délocalisés d'enzymes, de substrats, et de produits seront étudiés sur des intervalles de temps étendus en combinant une variété de types d'activation lumineuse avec des nouvelles techniques de FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») intra-protéique. Le FRET a été appliquée très largement pour étudier des interactions protéine-protéine, typiquement en utilisant des fluorophores génétiquement fusionnés à la protéine d'intérêt. Dans nos études, par contre nous incorporerons aussi bien des analogues d'acides aminés non-naturels en tant que marqueurs de FRET, aussi bien que nous utiliserons des chromophores naturellement présents dans la protéine, afin que l'ensemble permette le suivi de mouvements de domaines protéiques sans perturber la protéine elle-même. Dans les expériences de FRET, en général la fluorescence intégrée est mesurée, ce qui empêche la discrimination entre différentes configurations et limite la sensibilité de distance à l'ordre du radius de Förster ($\sim 50\text{\AA}$). Afin de combler ces limitations, la fluorescence sera détectée à la fois avec une résolution temporelle (femtoseconde) et spectrale pour accéder au régime de distances courtes (quenching fort) et permettre la discrimination de distributions de configurations et d'émission de fluorophores distincts. Le projet combine des compétences dans les techniques de spectroscopie avancée et de l'ingénierie de protéines et d'acides nucléique. Cela permettra de sonder des changements de distance et/ou d'orientation entre différents domaines protéiques pendant la transmission de signal, ainsi que des changements entre des protéines et leurs substrats lors des réactions enzymatiques. Nous développerons ces techniques pour une sélection représentative de systèmes protéiques impliqués dans la transformation et la régulation d'ADN et qui sont actuellement au coeur d'une communauté de recherche active. Ils incluent 1) Le facteur de transcription senseur de CO CoxA. Dans ce système, nous exploiterons la photolyse hème-ligand pour

initier la signalisation, et nous visualiserons les importants mouvements de domaines protéiques, mouvements connus qui se produisent lors du basculement de l'état CO-ligandé et actif vers l'état non-ligandé qui n'est pas capable de lier l'ADN. 2) La thymidylate synthase ThyX, un enzyme essentiel pour la synthèse d'ADN de novo dans de nombreux pathogènes bactériens. Ici, nous exploiterons le fait que le substrat folate et le cofacteur flavine forment une paire FRET naturel. Les changements de conformation pendant la catalyse seront suivis en associant des approches de Stop-Flow et de FRET résolu dans le temps. 3) La nucléase NucS, qui a été découverte récemment. Dans ce système, nous emploierons le saut de température impulsivement induit par la lumière pour étudier la dynamique d'interactions protéine-ADN en utilisant le marquage à la fois de brins d'ADN et de l'enzyme. 4) La photolyase, un enzyme de réparation d'ADN naturellement photoactivable, un système modèle pour étudier le phénomène de basculement des bases de l'ADN. Nous suivrons en temps réel le re-language, hors du site catalytique, de paires de bases endommagées par la radiation UV puis réparées, après les étapes catalytiques ultra-rapides induites par la lumière, tout en utilisant des stratégies de marquage similaires aux précédentes.

La disponibilité de structures pour tous ces systèmes protéiques facilite largement la faisabilité du projet. Ces développements peuvent être étendus à l'étude de la dynamique d'une grande variété de réactions catalytiques et de signalétiques, et finalement aussi à l'étude de la dynamique intra-protéine dans des systèmes intacts. Le projet s'appuie sur la forte synergie entre la spectroscopie biophysique, la biochimie, et la bioingénierie, tout en étant épaulé par des approches de modélisation moléculaire. En s'appuyant sur le module expérimental de la FRET résolue en temps et en spectre, pour chaque projet les développements spécifiques d'enzymes modifiés et de méthodes de déclenchement de réactions prendront place de manière intégrés et imbriqués.

Partenaires L.O.B. L.O.B.

Coordinateur VOS Marten
Laboratoire d'optique et biosciences

Aide de l'ANR 399799 k€

Durée 48 mois

Référence ANR-09-PIRI-0019

Label pôle

Titre du projet

ROSETTE

Mechanisms of podosomes/invadopodia auto assembly : theoretical and experimental investigations

Résumé

Ce projet se concentre sur un type d'adhérences cellulaires peu connues, mais qui jouent un rôle essentiel dans l'invasion cellulaire physiologique et pathologique des tissus cohésifs. Ces structures sont appelées podosomes dans les ostéoclastes et macrophages, et invadopodes dans les cellules métastatiques cancéreuses. Les podosomes/invadopodes possèdent la capacité extraordinaire de s'auto-assembler en supra structures en forme d'anneaux : les rosettes, dont le diamètre croit avec le temps. Cet auto-assemblage est indispensable aux capacités invasives cellulaires. La compréhension de cette fonction passe donc non seulement par la connaissance des enzymes impliquées mais aussi par celle des mécanismes à l'échelle supramoléculaire.

La formation des podosomes/invadopodes individuels est initialisée par la nucléation d'une colonne d'actine perpendiculaire au substrat sur lequel se trouve la cellule. Cette colonne est capable de se diviser comme montré par Evans et al. en 2003. L'assemblage des podosomes/invadopodes est strictement contrôlée par l'activité de la protéine tyrosine kinase Src. Src peut être sous formes quiescente, ou activée par des tensions mécaniques exercées sur des récepteurs de type intégrine (les récepteurs majeurs permettant l'adhérence cellulaire sur la matrice extracellulaire) ou par une interaction avec des partenaires. Non seulement Src est nécessaire à la formation des invadopodes/podosomes, mais il initialise également un rétro contrôle négatif qui implique le clivage par l'endoprotéase calpaine 2, (et donc l'inactivation), de divers composés des podosomes/invadopodes (dont Src lui-même), ce qui conduit au désassemblage de ces structures.

Sur la base de ces résultats expérimentaux, le but du projet est de définir un modèle minimal et prédictif de l'assemblage et la dynamique des rosettes de podosomes/invadopodes (Task 1). Cette modélisation donnera des tendances qui suggéreront sur un nombre limité de mécanismes clés de régulation impliqués dans ce phénomène. Les rosettes pouvant être suivies par vidéo microscopie sur des cellules vivantes grâce à l'expression de protéines de fusion

fluorescentes, un nombre important de paramètres sont mesurables (comme la vitesse d'expansion des rosettes, leur épaisseur, la distance entre les podosomes individuels, ou encore le diamètre des colonnes d'actine) permettent une étude quantitative. Les prédictions du modèle pourront donc être facilement confrontées aux résultats expérimentaux. Précisément, nous nous proposons de mesurer et cartographier l'activation de la kinase Src à l'aide de biosenseurs basés sur le FRET, et de vérifier la formation de gradient d'activité Src autour des rosettes et son absence au centre de la rosette. L'effet de la modulation activité de la calpaine 2 sur la dynamique des rosettes sera également étudié en modifiant génétiquement soit cette dernière, soit ses substrats (coractin, chaîne beta3 de l'intégrine, Src). Nous comparerons les résultats obtenus avec les prédictions du modèle (task2). L'activité de Src mesurée par biosenseurs sera corrélée à la cartographie 3D des forces générées par la rosette. Enfin, nous étudierons les déformations de la rosette générées par la création d'une anisotropie des tensions cellulaires induite par déformations locales par AFM, ou la micro structuration du support adhésif (task3). Les résultats obtenus conduiront à modifier et affiner le modèle.

Partenaires LPMCN IMRB

Coordinateur BLOCK Marc
Ontogénèse et Oncogénèse Moléculaire

Aide de l'ANR 251993 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0020

Label pôle

Titre du projet

STR-ASS-DEF-COL

Structures, interactions and interferences in the immediate and long-term protection by innate immune macromolecular complexes.

Résumé

Le système immunitaire a développé des composantes innée et adaptative qui coopèrent pour la protection de l'hôte contre les infections microbiennes. L'immunité innée met en jeu des molécules de reconnaissance constitutives capables d'identifier les signaux de danger et de déclencher des mécanismes effecteurs visant à limiter l'infection et éliminer les cellules apoptotiques, tout en protégeant l'intégrité de l'hôte. Les collagènes de défense solubles que nous étudions (C1q, MBL et ficolines) sont des médiateurs essentiels de l'immunité innée, du fait de leur capacité à identifier les microbes et les éléments du soi altéré et à interagir avec des protéases activatrices du complément ou des récepteurs spécifiques comme la calréticuline (CRT) et CR1. Cependant une activation inappropriée du complément par des ligands endogènes peut provoquer des pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes, tandis que certains pathogènes ont développé des stratégies d'infection en interférant avec les mécanismes de défense innée de leur hôte.

La CRT a un rôle bien connu en tant que chaperon moléculaire du reticulum endoplasmique, mais elle a aussi été caractérisée à la surface de cellules de mammifères où elle sert de marqueur des cellules apoptotiques, facilitant ainsi leur phagocytose. Des homologues de la CRT ont été identifiés dans différents parasites humains et il a été proposé qu'ils pourraient jouer un rôle général dans l'adaptation des parasites à leur environnement en facilitant leur évasion de la défense immune de l'hôte. En accord avec cette hypothèse, des études chez *T. cruzi*, le parasite responsable de la maladie de Chagas, suggèrent que TcCRT interagit avec C1q, ce qui pourrait empêcher l'activation du complément et participer à l'invasion des cellules de l'hôte en facilitant l'internalisation du parasite.

La compréhension détaillée des interactions moléculaires mises en jeu par les collagènes de défense dans l'activation du complément, dans la facilitation de la phagocytose et dans les mécanismes d'échappement des parasites apparaît donc cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les collagènes de défense sont des molécules oligomériques

uniques en forme de bouquets composés de tiges collagène et de domaines de reconnaissance globulaires trimériques. L'association de leurs régions collagène à des protéases modulaires dimériques (MASPs) ou tétramériques (C1s2-C1r2) ou au récepteur CR1 composé de 30 modules répétitifs donne naissance à des complexes de grande taille (supérieure à 600 kDa) et très flexibles. Le déchiffrement des bases structurales de ces assemblages requiert donc d'associer les méthodes classiques de cristallographie, appliquées aux différents domaines fonctionnels des partenaires, à des méthodes plus globales de microscopie électronique. Par ailleurs, si les CRTs sont de taille plus réduite (50 kDa), elles comportent un bras flexible central (domaine P) vraisemblablement inséré dans un domaine globulaire de type lectine si l'on se réfère à la structure du chaperon homologue calnexine, ainsi qu'une extrémité C-terminale très acide. Les sites de fixation de C1q ont été localisés dans un fragment des CRTs humaine et de *T. cruzi* recouvrant une partie des domaines N-terminal et P, capable d'inhiber l'activation de la voie classique du complément. Cependant, compte-tenu de l'information disponible sur la CRT, il apparaît peu probable que ce fragment représente une entité structurale. Une nouvelle stratégie de dissection structurale devra donc être appliquée en vue de la détermination des déterminants structuraux impliqués dans les interactions entre CRT et collagènes de défense.

Le projet réunit deux partenaires français avec une expertise complémentaire dans le domaine des relations structure-fonction des collagènes de défense et de leurs protéases associées. Le partenaire en biologie structurale regroupe des spécialistes de différentes disciplines, dans le but de lever les verrous scientifiques liés aux propriétés particulières des complexes étudiés.

Des collaborations extérieures assurent la pertinence « fonctionnelle » des études de calréticulines : CRT humaine avec G. Houen (Copenhague), et CRT de *T. cruzi*, avec A. Feirrer (Chili), ce qui permettra à terme de relier les interactions protéine-protéine étudiées avec leurs conséquences sur l'infectivité de ce parasite.

Partenaires

IBS

CoordinateurGABORIAUD Christine
Institut de biologie structurale**Aide de l'ANR**

173693 k€

Durée

36 mois

Référence

ANR-09-PIRI-0021

Programme « Interdisciplinaire de Recherche sur les systèmes moléculaires et cellulaires, et d'Innovation Biomédicale (PIRIBio) »

Edition 2009

Titre du projet**TODNAL**

Lésions oxydatives tandem de l'ADN, formation réparation et mutagenèse

Résumé

Les dommages de l'ADN sont continuellement créés au sein du génome par le stress oxydant qui est impliqué ou associé à de nombreuses pathologies humaines. Les espèces réactives de l'oxygène produites peuvent endommager les constituants cellulaires et notamment l'ADN dont l'intégrité est nécessaire au maintien de l'information génétique. Ce maintien est assuré par des systèmes de réparation qui sont chargés d'éliminer ces lésions. En ce qui concerne les lésions oxydatives, le système de réparation par excision de base (BER) est le plus impliqué. Malgré les efforts effectués ces dernières décennies pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de formation des lésions et l'impact de leur présence, des résultats récents suggèrent que des lésions dites tandem, où deux (ou plus) modifications de l'ADN contiguës sont générées, peuvent être produites par un seul évènement radicalaire. Des résultats préliminaires indiquent également que ces lésions sont beaucoup moins bien réparées par le BER que les lésions isolées.

Le projet vise donc à étudier la formation de ces lésions tandem, à déterminer l'efficacité des glycosylases impliquées dans le BER à les exciser, à comprendre d'un point de vue structural pourquoi cette efficacité est affectée et enfin à déterminer leur pouvoir mutagène. La formation de ces lésions issues d'un seul évènement radicalaire sera étudiée en utilisant inséré au sein d'un oligonucléotide un générateur photochimique d'un radical. Les produits issus de cette photolyse seront analysés par diverses approches physicochimiques afin de déterminer la nature et la quantité des lésions tandem produites. Les lésions tandem seront ensuite incorporées au sein d'oligonucléotides qui seront utilisés pour des études de réparation par des glycosylases et extraits cellulaires. En parallèle, des analyses structurales seront entreprises afin de comprendre comment la présence de lésions tandem peut affecter l'efficacité des glycosylases.

Enfin, la mutagénicité de ces lésions sera déterminé après transfection dans des cellules.

Ces travaux de recherche fondamentale visent à mieux comprendre les conséquences biologiques de ces lésions tandem. Ces connaissances sont nécessaires pour envisager des stratégies pour minimiser l'impact de ces lésions complexes ou au contraire profiter de leur nocivité afin d'optimiser des traitements à but thérapeutique.

Partenaires LRIG CBM

Coordinateur RAVANAT Jean-Luc
LABORATOIRE DE CHIMIE INORGANIQUE ET BIOLOGIQUE

Aide de l'ANR 181654 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0022

Label pôle

Titre du projet

VirProbe

Conception d'un microsysteme basé sur des sondes électrochimiques ultra-sensibles pour une multi-détection sans marquage d'acides nucléiques: application au génotypage HCV

Résumé

Le projet concerne la conception d'une plateforme de diagnostic miniaturisée (microsysteme) innovante permettant le génotypage rapide du virus de l'hépatite C (HCV). Avec 170 millions de personnes infectées dans le monde dont 600 000 en France, HCV constitue un problème majeur de santé publique. L'infection par HCV est impliquée dans l'incidence croissante des hépatocarcinomes observée dans de nombreux pays développés dont le Japon, l'Espagne, la France et l'Italie pour lesquels la proportion attribuable au HCV est estimée entre 50 et 70 %. Ce projet se situe dans le domaine en pleine expansion et donc très concurrentiel des biopuces à ADN de basse complexité dont les applications sont les analyses dédiées, effectuées en nombre, nécessitant des équipements peu coûteux, simples d'utilisation voire portables et des consommables jetables. L'originalité du projet repose entre autre sur un mode de détection directe très sensible et sans marquage des cibles d'acides nucléiques.

La réponse biologique du test est intimement liée aux séquences cible/sonde choisies. Le génotypage est un pré-requis nécessaire avant tout traitement (interféron pégylé/ribavurin) pour distinguer les patients répondeurs au traitement (génotypes HCV 2 et 3) des mauvais répondeurs (1 et 4) et définir un protocole antiviral optimal. Par ailleurs, le génotypage est indispensable pour effectuer une surveillance épidémiologique des souches circulantes. Une étude de séquences sur plus de 800 souches virales issues de donneurs de sang dépistés HCV (+) a déjà permis de sélectionner plusieurs sondes 18mères dans la région NS5b du génome viral permettant de différencier spécifiquement les sous-types majoritaires en Europe. Les séquences pertinentes pour le génotypage en NS5b seront identifiées et validées. Un panel (n = 300) de produits amplifiés de différents sous-types issus de plasma humains de donneurs HCV (+) sera constitué afin de valider les différentes étapes de développement.

Le principal point innovant du projet réside dans la synthèse et l'étude d'une nouvelle famille de sondes électrochimiques pour la détection ultra-sensible d'acides nucléiques (ADN ou ARN) par électrochimie. Des oligonucléotides d'anométrie

alpha (alpha-ODN) porteurs de nombreux groupements ferrocène (5 à 15) sur des liens internucléosidiques phosphoramidates ou phosphotriesters seront synthétisés et étudiés. Le positionnement des groupements rédox au plus proche de la région d'hybridation confère à ces sondes une extrême sensibilité. Des études préliminaires ont d'ores et déjà montré le maintien des propriétés d'hybridation des polyferrocenyl alpha-ODN ainsi que leur bonne spécificité de reconnaissance. En effet, les alpha-ODN modifiés gardent de bonnes propriétés d'hybridation contrairement aux bêta-ODN modifiés.

Une biopuce de multidétection fonctionnalisée par les différentes sondes d'intérêt pour le génotypage de HCV sera élaborée. Une chimie de greffage sur une surface d'or par la voie thiol sera étudiée dans un premier temps, sur un microcapteur à une électrode de travail. La caractérisation électrochimique du biocapteur sera menée de façon approfondie. Des mesures par voltamétrie cyclique, voltamétrie par pulses différentiels et par spectroscopie d'impédance seront notamment effectuées. La spécificité de reconnaissance des cibles par les sondes polyferrocenyl alpha-ODN sera étudiée. Puis, une stratégie d'adressage de plusieurs sondes sur un réseau d'électrodes sera envisagée. Le greffage des sondes par électro-activation d'un sel d'aryl diazonium sera étudié. Cette chimie de surface va permettre une multi-fonctionnalisation de la biopuce. Une intégration de la plateforme d'analyse dans un système fluide simple sera alors envisagée afin d'améliorer encore la sensibilité du test par une mesure en dynamique de la réaction d'hybridation sonde/cible. Nous espérons atteindre une limite de sensibilité de l'ordre de 10⁻¹⁵M.

Les performances du microsystème seront étudiées en termes de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité sur le panel biologique HCV (+) constitué.

Partenaires IBMM IBMM

Coordinateur CHAIX Carole
Sciences Analytiques

Aide de l'ANR 236392 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0023

Label pôle EuroBioMed ex ORPHEME

Titre du projet

Chromodyn

Mapping and modelling of chromosome dynamics

Résumé

L'organisation spatiale des gènes et chromosomes au sein des noyaux de cellules eucaryotes n'est pas aléatoire et joue un rôle important dans l'expression génique, le maintien de l'intégrité du génome et sa réplication. Malgré son importance, cette organisation dynamique reste encore très mal connue en raison d'importants obstacles techniques : la microscopie optique permet d'observer des loci génomiques marqués par fluorescence dans des cellules uniques vivantes, mais elle se heurte à une résolution limitée, le faible nombre de loci distinguables simultanément, et un manque d'outils informatiques pour l'analyse haute précision de données à haut débit. La technique de « capture de conformation chromosomique copie carbone » (5C) permet de quantifier les contacts physiques entre loci à l'échelle du génome entier, mais ne fournit pas d'informations directes sur les positions relatives de sites distants, ce qui rend les reconstructions 3D dépendantes des modèles supposés. Plusieurs approches théoriques et numériques ont été utilisées pour modéliser la dynamique des chromosomes. Cependant aucun modèle validé n'est actuellement capable de prédire précisément la position de loci arbitraires par rapport aux repères architecturaux du noyau ou par rapport à d'autres loci.

Ce projet vise à construire un modèle physique de l'organisation dynamique des chromosomes dans la levure à la résolution de la fibre de chromatine. Ce modèle devra prédire des propriétés aux conséquences fonctionnelles importantes, comme la probabilité que deux sites génomiques entrent en contact pour permettre la recombinaison homologue, ou les forces nécessaires pour déplacer la chromatine durant l'activation transcriptionnelle de certains gènes.

Notre approche pour construire ce modèle combine l'imagerie optique à haut débit, l'imagerie à haute résolution, et le 5C, avec de nouvelles techniques d'analyse de donnée et des simulations physiques validées par des expériences de biologie cellulaire.

Pour modéliser la dynamique à grande échelle des chromosomes, nous utiliserons des simulations de corps rigides déjà employées avec succès pour la fibre de chromatine. Pour calculer de façon autocohérente les paramètres géométriques et mécaniques nécessaires pour ce

modèle et prendre en compte leur inhomogénéité, nous développerons également des modèles reproduisant le polymorphisme du nucléosome et de la fibre de chromatine. Ce modèle multi-échelle intégrera de façon réaliste les composants clefs de l'architecture nucléaire, comme les microtubules reliant les centromères au centre organisateur des microtubules ou encore la région dense occupée par le nucléole. Les prédictions du modèle seront d'abord comparées à un jeu de données déjà disponible, sur la position de nombreux loci dans l'espace nucléaire et les uns par rapport aux autres. A partir de cette première comparaison, nous améliorerons le modèle de façon itérative en le testant au fur et à mesure sur de nouvelles expériences.

Pour l'imagerie in vivo, nous poursuivrons l'approche de marquage ciblé que nous avons utilisée précédemment. Sur la base de données préliminaires indiquant que la distance génomique détermine fortement la position intranucléaire et relative de loci génomiques, nous nous concentrerons d'abord sur trois bras chromosomiques de tailles représentatives. Nous utiliserons une stratégie dichotomique pour marquer des paires ou triplets de loci à des échelles de plus en plus fines le long de ces bras. Nous testerons notre modèle sur ce jeu de données, puis nous implémenterons une stratégie de marquage massive, consistant à marquer des combinaisons aléatoires de loci dans des centaines de souches différentes. Nous utiliserons un microscope optique automatisé pour obtenir efficacement des informations positionnelles sur des millions de cellules par population. Nous poursuivrons le développement d'algorithmes permettant d'extraire cette information des images, et mettrons au point des techniques nouvelles pour augmenter fortement la résolution spatiale des cartes de densités de probabilité. Nous développerons des techniques de triangulation statistiques capables de reconstruire les configurations 3D de loci et chromosomes à partir de densités de probabilité 1D et 2D obtenues dans des expériences différentes. Ces algorithmes seront modifiés pour analyser des données d'imagerie et de 5C simultanément. En complément, nous utiliserons et améliorerons un microscope optique super-résolutif pour résoudre des pores nucléaires individuels et décrire la configuration de chromosomes dans des cellules individuelles. Nous effectuerons plusieurs expériences pour altérer les contraintes mécaniques dans le noyau et pour tester le pouvoir prédictif du modèle. Une fois validé, ce modèle servira de base pour analyser les mécanismes physiques à l'œuvre dans la transcription, la réparation, et la réplication du génome.

Partenaires LPTMC

Coordinateur ZIMMER Christophe
Groupe à 5 ans Imagerie et Modélisation

Aide de l'ANR 294320 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0024

Label pôle

Titre du projet

CONE

Cellular Orientation in Non-homogeneous Environments

Résumé

La compréhension des mécanismes d'orientation des cellules vivantes est essentielle tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. La plupart des modèles d'orientation cellulaire portent sur des stimulations directionnelles simples, en espace et en temps. En pratique, les stimulations auxquelles les cellules sont soumises sont bien plus fluctuantes. Les expériences de laboratoire, les simulations numériques et les modèles proposés dans ce projet tournent tous autour de la même question: *comment les cellules arrivent-elles à s'orienter dans des environnements inhomogènes caractérisés par des barrières, des régions de piégeage et des signaux chimiotactiques variables ou même conflictuels ? * Les travaux les plus en pointe sur cette question donnent des renseignements précieux mais ils restent largement qualitatifs. Il nous semble donc pertinent et opportun de mettre en place des approches plus quantitatives.

Parmi les nombreux modèles biologiques pour lesquels cette question est pertinente, nous avons sélectionné trois organismes modèle: le guidage des axones, la chimiotaxie de /E. coli/ et celle de Dictyostelium discoideum. Ce faisant, nous avons choisi de garder une perspective large sur le problème de l'orientation cellulaire. Nous sommes en effet convaincus que la comparaison entre les solutions trouvées au cours de l'évolution par différents organismes est très importante, en particulier mais pas seulement, pour la modélisation.

Les tâches spécifiques auxquels nous nous attacherons sont les suivantes:

1) Nous développerons un nouveau système d'étude du guidage axonal basé sur les "microstickers », une technologie nouvelle pour la construction de dispositifs microfluidiques. Les microstickers permettront d'analyser l'orientation des axons en présence de stimulations chimioattractantes de GABA, statiques ou variables en temps et en espace. Ces données serviront pour modéliser les processus d'amplification et de filtrage du bruit dans la réponse axonale à des gradients externes.

2) Nous analyserons le processus d'orientation de Dictyostelium discoideum en présence de stimuli de AMPc périodiques en espace et en temps afin de mesurer la réponse fréquentielle des cellules. Nous nous attendons au

comportement d'un filtre passe-bas et déterminerons la fréquence de coupure et le déphasage du filtre. Les modèles théoriques prédisent des réponses similaires pour des gradients statiques mais différent pour des stimulations dynamiques. Les expériences proposées sont donc essentielles pour pouvoir discriminer parmi les différents modèles et faire avancer l'état de l'art dans le domaine.

3) Nous utiliserons nouvelle méthode d'inférence pour mesurer la fonction de réponse chimiotactique des bactéries. L'avantage majeur de notre nouvelle méthode est sa nature non-intrusive qui va nous permettre de mettre en relation les propriétés de la fonction de réponse chimiotactique et les propriétés de la nage des bactéries. Les données ainsi obtenues seront aussi utilisées pour tester un nouveau modèle théorique, basé sur la théorie des jeux contre la nature, qui produit des prédictions pour la fonction de réponse et sa variabilité au sein d'une population bactérienne.

4) La nage de E. coli en géométrie confinée sera analysée afin de déterminer la nature hydrodynamique vs biochimique de la réduction des tumblings observée au voisinage d'une surface. Nous étudierons aussi la nage en zigzag de E.coli dans un environnement "poreux" dans lequel un grand nombre d'obstacles, réalisés grâce à une matrice de micropiliers, sont présents.

Notre but est de mesurer le courant de bactéries (permeabilité) induit par un gradient de chimioattractant (loi de Darcy) dans ce milieu poreux microfluidique. Cela nous renseignera sur le comportement de E. coli en fonction de la densité du reste de la colonie environnante (représentée ici par la densité de piliers).

En conclusion, nous sommes confiants que ce projet : (i) produira des progrès notables dans la compréhension des processus fondamentaux d'orientation cellulaire, (ii) permettra de faire avancer les connaissances et la modélisation des trois systèmes modèles considérés, (iii) apportera de nouveaux outils microfluidiques d'intérêt général pour les sciences du vivant.

Partenaires LKB PCS

Coordinateur VERGASSOLA Massimo
Génétique In Silico

Aide de l'ANR 147000 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0025

Label pôle

Titre du projet

DynaBiofilm

Propriétés physiques locales du biofilm et leur rôle dans la dynamique interne de l'édifice sondé par des micro-colloïdes magnétiques insérés.

Résumé

Les biofilms sont des assemblages bactériens associés aux surfaces qu'elles soient biologiques ou artificielles. Ils se forment par des mécanismes d'adhésion-croissance couplés à la production de polysaccharides extracellulaires qui probablement à la fois protègent et stabilisent l'édifice formé par ces biofilms. Ces structures, très répandues - c'est le principal écosystème bactérien - ont un impact socio-économique majeur. On les retrouve à l'origine de problèmes comme la détérioration des surfaces, les contaminations alimentaires, les dérèglements hydrauliques ou les maladies nosocomiales. À l'opposé, ces architectures bactériennes sont aussi exploitées profitablement comme usines de transformation dans un nombre croissant d'applications environnementales - dépollution de l'eau, décontamination des sols, bioremédiation en général.

Ces communautés bactériennes associées aux surfaces ont démontré plusieurs spécificités physiologiques dont l'une, critique, est leur plus grande résistance aux anti-microbiens comparée aux espèces planctoniques. On sait que l'expression génétique au sein de ces structures est altérée et que la croissance de ces cellules en 3D produit de fortes hétérogénéités d'environnement qui sont encore mal connues. On sait aussi que certains facteurs moléculaires, comme des adhésines de surface favorisent le développement de ces assemblages. On a donc une bonne connaissance des composantes moléculaires associées à ce mode de vie. En revanche, on comprend encore mal quels sont les mécanismes qui gouvernent le développement de la structure, l'équilibre de détachement-croissance ou la sociobiologie de l'ensemble lorsque des espèces multiples sont concernées comme c'est toujours le cas dans la nature. Une meilleure connaissance de ces mécanismes serait pourtant très utile pour répondre aux multiples aspects socio-économiques posés par les biofilms.

Nous proposons ici un projet fondé sur notre conviction profonde qu'une approche pluri-disciplinaire pourrait faire progresser la compréhension de ces systèmes cellulaires complexes. Nous voulons ici associer les concepts et les méthodes de la matière molle à la génétique du biofilm de

manière à étudier cet objet sous un angle nouveau.

Notre objectif est de mener à bien une définition et une caractérisation fiable des propriétés physiques du biofilm pour explorer leur rôle dans la dynamique interne de l'assemblage. Nous projetons d'étudier les aspects dynamiques purement physiques - ceux qui concernent la matière inerte du biofilm, fluides, polymères, nanoparticules artificielles - et ceux qui concerne le matériel vivant - c'est-à-dire les cellules elles-mêmes. De façon à évaluer la pertinence des propriétés physiques d'un tel édifice du point de vue biologique, nous étudierons les propriétés physiques en liaison avec les caractéristiques moléculaires que l'on aura maîtrisé grâce aux outils de génétique apportés par le partenaire 2 du projet. Les propriétés physiques seront pour la première fois explorées de l'intérieur de la structure en introduisant dans le biofilm des colloïdes magnétiques micrométriques qui serviront de sondes de force et de rhéologie locales. La dynamique interne sera également caractérisée grâce au suivi de différentes sondes fluorescentes - petites molécules polaires, polymères hydrophiles, nanoparticules - également introduites au sein du biofilm.

En mettant en 'uvre une nouvelle approche méthodologique, nous pensons pouvoir accéder à l'éclaircissement de la relation qui lie les propriétés physiques du biofilm à ses propriétés moléculaires et à sa dynamique interne, c'est à dire à son fonctionnement biologique intime dans une logique où les propriétés physiques sont combinées aux évènements biochimiques pour produire ce système vivant et sophistiqué.

Nous voudrions que ce projet soit l'amorce d'un ralliement à la fois d'expérimentateurs de plusieurs disciplines mais aussi de théoriciens des modèles tournés vers l'étude de la biophysique du biofilm, ralliement que nous souhaiterions initier au cours du projet.

Partenaires UGB

Coordinateur HENRY Nelly
Unite physico-chimie Curie

Aide de l'ANR 216840 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0026

Label pôle

Titre du projet

MICEMICO

Migration cellulaire en milieu confiné

Résumé

La capacité à migrer dans un espace restreint est essentielle pour la fonction des leucocytes, les principales cellules du système immunitaire. De plus, ce type de migration peut être adopté par les cellules tumorales les plus agressives et contribuer à leur capacité à envahir des tissus sains. Nous proposons une approche interdisciplinaire afin d'atteindre les buts suivants:

1-Définir à la fois les principes physiques et les mécanismes cellulaires qui sont à l'origine de la migration des cellules en milieu confiné. Pour cela nous effectuerons tout d'abord une étude détaillée de ce mode de migration, en utilisant une combinaison de modélisation, de micro-fabrication et de microscopie à haute résolution du cytosquelette des cellules en migration. En parallèle, et en se basant sur les résultats théoriques et technologiques décrit ci-dessus, nous concevrons et réaliserons un criblage par shRNA, basé sur de la vidéo-microscopie de cellules en migration dans des systèmes micro-fabriqués, afin d'identifier les protéines impliquées dans la migration en milieu confiné. Nous utiliserons deux modèles cellulaires: (i) les cellules dendritiques, sentinelles du système immunitaire, utilisée pour les stratégies d'immunothérapie anticancéreuse et (ii) des cellules tumorales invasives.

2. Evaluer la contribution des mécanismes et protéines identifiés à (i) la réponse immune (ii) l'invasion des tissus par les cellules tumorales. Pour cela nous utiliserons des techniques de microscopie in vivo de pointe, combinées à des modèles murins.

3. Identifier des molécules qui peuvent être la cible de traitements pharmacologiques afin de moduler la migration cellulaire dans le contexte d'une thérapie anticancéreuse. Pour cela nous validerons nos découvertes aux cellules dendritiques et tumorales humaines. Le potentiel thérapeutique de nos découvertes sera évalué selon deux aspects potentiels du traitement anticancéreux: (i) l'activation de la migration des cellules dendritiques afin d'augmenter l'efficacité des stratégies de vaccination anti-tumorale et (ii) l'inhibition de l'invasion des tissus sains par les cellules tumorales

En conclusion, notre projet nous amènera à identifier des mécanismes nouveaux et importants qui contrôlent la

migration des cellules dendritiques et des cellules tumorales dans des milieux confinés tels que les espaces interstitiaux des tissus. Une action pharmacologique sur ces mécanismes de migration pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies anti-tumorales.

Ce projet va de la physique théorique des gels actifs, qui nous fournira un cadre pour évaluer l'importance de différents paramètres qui affectent la migration cellulaire dans les milieux confinés, jusqu'au champ biomédical, en passant par la validation in vivo sur des modèles murins et l'utilisation de systèmes in vitro micro-fabriqués permettant de faire de la biologie cellulaire quantitative.

Ce projet couvre donc un très large éventail d'approches méthodologiques pour se concentré sur une question biologique fondamentale: comment les cellules migrent elles dans les tissus ?

Partenaires U 932 U 932 CNRS

Coordinateur Piel Matthieu
COMPARTIMENTATION ET DYNAMIQUE CELLULAIRE (CDC)

Aide de l'ANR 197516 k€

Durée 48 mois

Référence ANR-09-PIRI-0027

Label pôle

Titre du projet

Moonlight

Predicting MOONLIGHTing proteins from protein-protein interaction networks

Résumé

Certaines protéines assurent plusieurs fonctions différentes dans la cellule. Ces protéines multifonctionnelles sont appelées collectivement 'moonlighting' protéines. Ceci fait référence à l'anglicisme désignant le fait d'avoir un deuxième emploi au noir. Parce que la fonction des protéines est principalement étudiée expérimentalement par des approches visant à vérifier des hypothèses, la découverte de protéines moonlighting résulte principalement de la convergence inattendue de résultats expérimentaux. Par conséquent, peu de protéines moonlighting ont été identifiées (environ 50 chez l'homme) en dépit d'un intérêt grandissant pour cette singularité fonctionnelle. Par exemple, un nombre croissant de protéines impliquées dans l'endocytose apparaissent également comme régulant d'expression des gènes, et il a été démontré que plusieurs protéines cytoplasmiques assurent une fonction différente de leur fonction habituelle lorsqu'elles sont exportées à la surface de cellules tumorales.

Des méthodes dédiées à la découverte de protéines moonlighting sont donc nécessaires. A cette fin, nous proposons une approche bioinformatique, non biaisée et applicable à l'échelle de protéomes entiers.

Ce projet vise à identifier des protéines moonlighting par l'étude de leurs partenaires d'interactions dans le réseau d'interactions protéine-protéine. En effet, les protéines assurent leurs fonctions grâce à des interactions physique avec d'autres protéines, et l'ensemble de toute ces interactions dans la cellule forme un immense réseau. Etant donné que les protéines moonlighting doivent interagir avec des groupes de partenaires différents pour assurer leurs différentes fonctions, nous devons être capable de reconnaître des protéines à l'intersection de plusieurs groupes de protéines, chaque groupe étant associé à une fonction. Ce projet vise à :

- développer de nouveaux algorithmes de partitionnement de graphes et des méthodes permettant de classer les protéines/sommets dans des classes chevauchantes (WP1)
- explorer la représentation sémantique de la fonction des gènes (dans Gene Ontology) en utilisant des méthodes statistique afin de définir une mesure de

l'association et de la répulsion des annotations GO au sein d'une même description (WP2). Cela devrait permettre d'identifier des fonction cellulaires de protéines moonlighting (WP3);

- appliquer les méthodes développées dans WP1 et WP2 pour des études à grande echelle d'interactomes visant à prédire les protéines moonlighting de plusieurs organisms (WP3)

Les résultats de ces travaux, à l'interface biologie-informatique, devraient contribuer à établir de nouvelles hypothèses qui pourront ultérieurement être testées expérimentalement.

Partenaires IML

Coordinateur BRUN Christine
TECHNOLOGIES AVANCEES POUR LE GENOME ET LA CLINIQUE

Aide de l'ANR 132084 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0028

Label pôle

Titre du projet

NANOCHEMCELL

Chemical Nano-Imaging of the Dopaminergic Cell

Résumé

Le contexte général du projet est le développement de méthodes d'imagerie chimique avancées afin de comprendre des processus biologiques complexes, tels que les réactions chimiques au sein des neurones dopaminergiques. Le projet est basé sur l'imagerie chimique multimodale de la cellule avec des techniques de haute résolution spatiale et sensibilité, couplées à de la microscopie optique de haute résolution. Une approche multimodale complémentaire se révèle nécessaire pour appréhender les mécanismes qui gouvernent les interactions entre neurotransmetteurs (dopamine), éléments chimiques (fer), et les protéines impliquées dans l'homéostasie du fer ou de la dopamine. Nous supposons que le fer et la dopamine pourrait former des complexes fer-catecholamine extrêmement réactifs dans la cellule.

Le projet utilise 3 instruments aux capacités uniques pour l'imagerie chimique à l'échelle subcellulaire : le nano-SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), la nano-sonde rayonnement synchrotron, et la nano-sonde de protons. Ces instruments sont les plus performants au monde en terme de résolution spatiale et de sensibilité pour l'imagerie des éléments chimiques, et possèdent des caractéristiques complémentaires : analyse isotopique en SIMS, spéciation chimique par spectroscopie d'absorption de rayonnement X (synchrotron), et quantification locale hautement précise par faisceau e protons. Ces instruments seront utilisés en complément de l'imagerie neurochimique par microscopie confocale et d'épifluorescence mise en l'uvre par une équipe de neurobiologistes hautement expérimentés. Le premier objectif du projet sera purement méthodologique, il s'agira d'élaborer et de valider les protocoles pour l'imagerie chimique quantitative dans une approche de comparaison inter-laboratoire.

En dépit des nombreuses preuves de l'augmentation de la teneur en fer dans la substantia nigra pars compacta des patients atteints de la maladie de Parkinson, les résultats publiés dans la littérature pour la distribution du fer dans la SNpc à l'échelle cellulaire et moléculaire sont encore rares et controversés. Ces données manquantes sont cependant essentielles pour comprendre le rôle du fer dans la mort des cellules neuronales. Différents sites de fixation du fer ont été

proposés, neurones dopaminergiques, cellules gliales, corps de Lewy, neuromélanin ' On ne sait toujours pas quels sont les types cellulaires impliqués dans l'accumulation du fer ni dans quels compartiments cellulaires cette accumulation a lieu. De plus, un processus d'hyper-oxydation, en présence de Fe(II) qui catalyse la production de radicaux libres pourrait jouer un rôle important dans la mort des cellules dopaminergiques.

La nano-imagerie chimique sera mise en 'uvre à la fois sur des cellules en culture et sur des coupes de cerveau de rat. Les modèles in vitro des cellules dopaminergiques seront particulièrement utiles pour identifier les compartiments subcellulaires de l'interaction fer-dopamine (comme par exemple les vésicules neuronales). Les modèles animaux permettront d'explorer l'accumulation du fer dans les cellules dopaminergiques d'un organisme complexe, mais également dans le tissu extracellulaire environnant et les cellules gliales. Les conditions physiologiques seront comparées à des conditions de déplétion en dopamine comme modèle d'étude de la maladie de Parkinson. L'imagerie cellulaire de la dopamine, du fer, et des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer et de la dopamine (TH, DAT, ferritine,...) sera effectuée. Le statut redox du fer et du soufre sera également analysé par spectroscopie XAS pour évaluer l'hypothèse d'hyper-oxydation.

Partenaires INSERM

Coordinateur ORTEGA Richard
Chimie Nucléaire Analytique et Bio-environnementale

Aide de l'ANR 169728 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0029

Label pôle

Titre du projet

PAGDEG

Causes and consequences of protein aggregation in cellular degeneration

Résumé

Dans ce projet, nous proposons de développer des approches pluridisciplinaires concernant le vieillissement et la mort cellulaire (induite par antibiotiques) chez *Escherichia coli*. Il s'agit en effet non seulement de l'être vivant le mieux connu, mais aussi du modèle expérimental le plus simple de vieillissement. Nous adoptons donc une hypothèse fortement suggérée par les données expérimentales, selon laquelle le vieillissement est un processus universel que l'on retrouve dans tous les organismes, jusqu'aux bactéries. Du point de vue cellulaire, le vieillissement semble être dû à l'accumulation de dommages au cours du temps, dégradant les fonctions de la cellule et donc sa survie. Cependant, la plupart des aspects liés au vieillissement sont encore très mal compris. Par exemple, des individus identiques génétiquement, placés dans un environnement homogène et constant, peuvent présenter des vitesses de vieillissement différentes, même dans un système expérimental unicellulaire bien contrôlé, comme les bactéries ou les levures. Notre proposition a pour but de comprendre l'un des phénomènes principaux impliqués dans la dégénérescence cellulaire, à savoir l'agrégation protéique. Nous avons montré récemment qu'*E. coli* vieillit par un processus impliquant l'accumulation de protéines agrégées. L'importance de ce résultat est bien entendu amplifiée par le fait que l'agrégation protéique est aussi un marqueur du vieillissement chez l'homme et est à l'origine de nombreuses maladies liées à l'âge, dont les retombées en termes d'économie et de santé publique sont énormes (i.e. maladies neurodégénératives, comme Alzheimer ou Parkinson). Ces questions sont aussi centrales dans le problème de la résistance aux antibiotiques, un problème vétérinaire et de santé publique lui aussi émergent. Bien qu'ayant été décrit il y a plus de 60 ans, il n'est compris actuellement (et encore, de façon partielle) que pour une petite fraction des antibiotiques (e.g. bêta-lactames). Nous étudierons aussi la dégénération cellulaire à la suite de traitements antibiotiques provoquant la production de protéines aberrantes et leur agrégation (e.g. streptomycine), comme modèle d'évasion du traitement antibiotique et de la mort qu'il aurait dû induire. Pour satisfaire ces objectifs, notre proposition mélange donc de façon intime des approches

expérimentales innovantes (nanofabrication et microfluidique, analyse d'images, microscopie de fluorescence quantitative) avec des approches de simulation / modélisation (modélisation à base d'individus, systèmes dynamiques continus). Cette plateforme expérimentale, qui peut être adaptée à d'autres modèles biologiques, est basée sur des solutions innovantes et des avancées en ce qui concerne non seulement la question biologique traitée mais aussi les disciplines représentées (mathématiques appliqués, nanotechnologie et informatique).

Partenaires CRI Grenoble R Alpes PASTEUR

Coordinateur LINDNER Ariel
LABORATOIRE DE GENETIQUE MOLECULAIRE EVOLUTIVE ET MEDICALE

Aide de l'ANR 221096 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0030

Label pôle

Titre du projet

HISTONEDUB

Bases moléculaires de la régulation de l'activité de Deubiquitination des histones

Résumé

Les modifications post-traductionnelles des histones sont cruciales pour la régulation de la transcription chez les eucaryotes. La vision émergente actuelle est que les défauts dans ces mécanismes cellulaires aboutissent à différentes maladies, y compris le cancer. Plusieurs modifications des histones sont connues qui influencent à la fois la structure de la chromatine et le recrutement des effecteurs de la transcription. Parmi ces modifications, l'ubiquitination et la déubiquitination des histones H2A et H2B jouent un rôle importants dans la régulation de plusieurs processus du noyau, y compris dans le silencing et la réparation de l'ADN.

L'effecteur de la transcription SAGA est un grand complexe multi-protéique qui est impliqué dans de nombreux mécanismes du noyau, allant de la transcription à l'export des ARNm. Il a été montré que SAGA acétyle les histones à travers son sous-module GCN5 (composé des protéines Gcn5, Ada2, Ada3 et Sgf29) et, plus récemment, déubiquitinye l'histone H2B à travers son sous-module DUB (composé des protéines Usp22, Ataxine-7, Ataxine-7-L3 et Eny2). Le sous-module DUB attire actuellement fortement l'attention car il apparaît comme étant au croisement de la transcription, par son activité de déubiquitination, mais aussi de l'export de l'ARNm à travers sa sous-unité Eny2. Il est à noter que le seul le sous-module DUB entier possède une activité de déubiquitination, indiquant un effet régulateur positif sur l'activité de la sous-unité catalytique Usp22 de la part des autres sous-unités. Encore plus important, Usp22 a été montrée comme étant impliquée dans certains cancers, tandis qu'une extension poly-glutamines à l'extrémité N-terminale de l'Ataxine-7 est la cause de l'ataxie spinocérébrale de type 7 (SCA7) qui aboutit à des dégénérescences de la rétine.

Le projet HISTONEDUB s'intéresse à la caractérisation des mécanismes moléculaires de déubiquitination effectués par le sous-complexe DUB du complexe de transcription SAGA humain. Cette étude permettra de comprendre les bases moléculaires des maladies causées par ce module. Nous allons entreprendre l'étude de l'architecture et de la fonction du sous-complexe DUB de SAGA en utilisant une approche intégrée combinant biologie structurale, moléculaire et cellulaire. La cristallographie et la RMN seront fortement

associées, amenant une information sur la structure mais également sur les propriétés dynamiques de ce complexe. La combinaison de ces approches structurales complémentaires permettra une meilleure compréhension non seulement de l'assemblage de ce complexe, mais aussi de ses mécanismes de régulation de l'activité de déubiquitination. Cette connaissance sera ensuite utilisée pour mettre en place des expériences de biologie moléculaire et cellulaire ayant pour but la compréhension de la fonction du sous-complexe DUB et ses implications dans les maladies, notamment de l'effet de l'extension polyglutamine dans le processus de déubiquitination. En ce sens, le projet s'attaquera non seulement à un sujet biologiquement très important, mais permettra également d'établir une preuve de faisabilité pour de futures études structure/fonction de complexes macromoléculaires.

Partenaires CNRS INSERM INSERM

Coordinateur Kieffer Bruno
UMR 7104 / UMR_S 596 INSTITUT DE GENETIQUE ET DE
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Aide de l'ANR 275080 k€

Durée 36 mois

Référence ANR-09-PIRI-0031

Label pôle

Titre du projet

DELTAV

Understanding the physical basis for pressure effects on protein folding

Résumé

Définir les déterminants physico-chimiques de la stabilité et du repliement des protéines dans des conditions normales et pathologiques a constitué un domaine de recherches important en biochimie physique depuis plus d'un demi-siècle. Et, malgré les progrès importants vers ce but, un nombre de questions importantes subsistent. Elles comprennent la caractérisation des propriétés structurales, dynamiques et thermodynamiques des barrières entre états conformationnels du paysage énergétique des protéines, la compréhension de l'effet de séquence sur la coopérativité du repliement, la définition plus claire du rôle du solvant dans le contrôle de la stabilité et la dynamique des protéines, et l'investigation des états excités du bassin natif, et leur rôle dans le mauvais repliement et l'agrégation. Fondamentaux pour l'élucidation des ces questions est un paramétrage thermodynamique complet des déterminants du repliement protéique. Contrairement à la compréhension satisfaisante et très utile des effets de la température sur la structure des protéines, les mécanismes physiques des effets de la pression demeurent obscurs. L'objectif de la recherche proposée est de déterminer qualitativement et quantitativement les mécanismes physiques des effets de la pression sur le repliement des protéines en se basant sur plusieurs systèmes protéiques modèles, choisi avec soin, et en utilisant de multiples approches expérimentales, théoriques et computationnelles. Une compréhension plus profonde des effets de la pression sur les protéines permettront des gains significatifs dans la compréhension des barrières du repliement, le rôle de la solvation et les déterminants de la coopérativité de ce processus biologique fondamental. Ces informations seront utiles dans de nombreuses applications pratiques en biotechnologie et biopharmaceutique impliquant les protéines.

Partenaires

Coordinateur ROYER Catherine
Centre de biochimie structurale INSERM

Aide de l'ANR 363378 k€

Durée 48 mois

Référence ANR-09-PIRI-0007

Label pôle