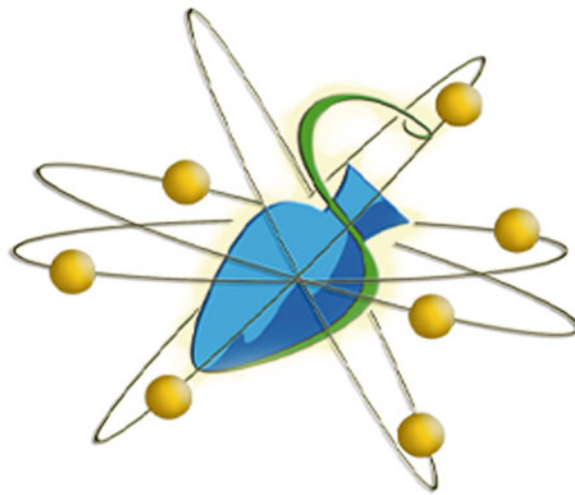


5^{ème} Journée de la Recherche

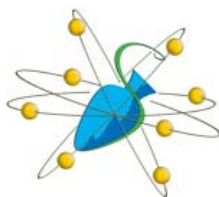


de la Faculté de Pharmacie

Inserm



Mercredi 26 Mars 2008



Editorial

Aujourd'hui, 26 mars 2008, a lieu la 5^{ème} Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie.

Cette journée a comme objectif, non seulement de renforcer les liens entre nos laboratoires et nos partenaires des Universités d'Aix-Marseille et en particulier du Campus Santé Timone, mais aussi d'assurer une meilleure sensibilisation de nos étudiants à la Recherche.

Comme l'édition précédente, nous avons souhaité donner la parole aux étudiants en leur adressant ce message :

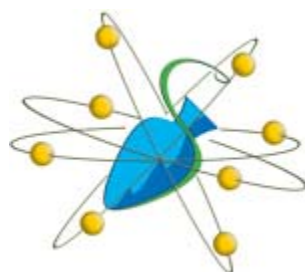
« **Faites de la Recherche** ».

Cette dynamique de la Recherche réalisée au sein de notre UFR s'inscrit également dans la mise en place du nouveau contrat quadriennal avec la reconnaissance de nos unités et équipes de recherche et dans l'application de réformes majeures telles que l'intégration de la Pharmacie au CHU, ou l'autonomie des universités.

Nous tenons à remercier tous les orateurs et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette journée, en espérant qu'elle permettra d'intensifier les communications indispensables aux synergies dans le monde de la Recherche.

Patrice VANELLE
Doyen

Françoise DIGNAT-GEORGE
*Vice-Doyen chargé de la Recherche
et de la valorisation*



Programme de la Journée

12h00 - 14h00

Communications autour des posters

14h30 - 14h45

Ouverture de la 5^{ème} Journée de la Recherche

Professeur F. Dignat-George et Professeur P. Vanelle.

14h45 - 15h45

Conférence : L'imagerie, des modèles expérimentaux aux applications cliniques.

Professeur O. Mundler, Professeur C. Oliver et Professeur P. Pisano

15h45 - 17h05

Communications orales par les étudiants en thèse

C. Thabuis - UMR INSERM 476 - INRA 1260

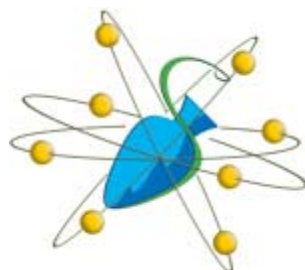
F. Bittar - URMITE UMR CNRS 6236 - IRD 3R198

E. Belotti – UMR INSERM 891

J. Alencar - UMR INSERM 491

17h05 - 17h30

Clôture de la journée



Communications orales

C. Thabuis :

UMR INSERM 476 - INRA 1260 - Université de la Méditerranée

Oleoyl-ethanolamide and its non-hydrolysable analog reduce body fat mass in high fat fed mice by increasing post prandial lipid oxidation

F. Bittar

URMITE UMR CNRS 6236 IRD 3R198 - Université de la Méditerranée

Inquilinus limosus : an Easily Missed Emerging Resistant Respiratory Pathogen in Cystic Fibrosis Patients

E. Belotti

UMR INSERM 891 - Université de la Méditerranée

Functional studies of Vangl2 with its partner Scrib in cell migration

J. Alencar

UMR INSERM 491 - Université de la Méditerranée

Development of the sesamol and dry emulsion containing the association of HPMC-sucrose or sodium caseinate-sucrose by freeze-drying and spray-drying techniques

OLEOYL-ETHANOLAMIDE AND ITS NON-HYDROLYSABLE ANALOG REDUCE BODY FAT MASS IN HIGH FAT FED MICE BY INCREASING POST-PRANDIAL LIPID OXIDATION

Thabuis C¹, Destailats F², Tissot-Favre D², Maillot M¹, Martin JC¹

1 INSERM, 476 "Nutrition Humaine et Lipides", Marseille, F-13385 France; INRA 1260, Marseille, F-13385 France; Univ Méditerranée Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine, IPHM-IFR 125, Marseille, F-13385 France; 2 Nestlé Research Centre, CH-1000 Lausanne Switzerland.

Background:

Exogenous oleoylethanolamide (OEA) regulates feeding and body weight gain through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor- α signaling pathway in the intestine. OEA could also regulate food intake through binding to the G-protein coupled receptor GPR119.

Objectives:

Our aim was to evaluate the body fat lowering effect of OEA on diet-induced obesity (DIO) mice by comparison to its non hydrolysable analog KDS 5104 upon chronic oral administration.

Procedure:

Male C57BL6j mice were challenged with a DIO diet enriched with either 100 mg/kg bw of OEA or KDS-5104 for 5 weeks (n=10 per group). Control mice received only the DIO diet. Food intake and weight gain were monitored. Lipid and carbohydrate oxidations were evaluated using indirect calorimetry. The expression of genes involved in food intake and body fat mass regulations was measured by real-time quantitative PCR.

Results:

Orally administrated OEA and KDS significantly lowered food intake (-6%, $P < 0.05$) over the 5 weeks, decreased adipose tissue (AT) mass (-18%, $P < 0.05$) and body weight gain (-8%, $P < 0.05$). Both N-acylethanolamine derivatives increased the oxidation of lipid substrates, and decreased the oxidation of carbohydrate substrates. OEA also increased total energy expenditure, but not KDS. Both molecules increased the cumulated total activity (post-prandially and over 24h). These results were associated to an up-regulation of some genes involved in lipid oxidation (CPT 1 in intestine and liver, FIAF in intestine and AT), in lipogenesis (SREPB1c in liver), in food intake control (intestinal CCK and GPR119), and endocannabinoid signaling (adipose CB1).

Conclusion:

Our data suggest that orally administrated OEA is highly bioavailable and as biologically potent as its non-hydrolysable analog to reduce body weight gain and fat mass in high fat fed mice. This would be achieved mostly by modifying energy balance, especially during the post-prandial period (lipid oxidation).

Inquilius limosus: an Easily Missed Emerging Resistant Respiratory Pathogen in Cystic Fibrosis Patients

Fadi Bittar¹, Anne Leydier², Emmanuelle Bosdure², Alexandre Toro¹, Martine Reynaud-Gaubert³, Stéphanie Boniface³, Nathalie Stremler², Jean-Christophe Dubus², Jacques Sarles², Didier Raoult¹, and Jean-Marc Rolain¹

1 – URMITE UMR 6236, CNRS-IRD, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

2 - Département des Maladies Respiratoires, Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose Enfants (CRCM), Hôpital Timone, Marseille, France.

3 - Département des Maladies Respiratoires, Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose Adultes (CRCM), Hôpital Sainte Marguerite, Marseille, France.

* corresponding author : Pr Jean-Marc ROLAIN

Phone : (33) 4 91 32 43 75.

Fax : (33) 4 91 38 77 72.

Email: jm.rolain@medecine.univ-mrs.fr

Objectives :

Inquilius limosus is a new multiresistant bacterium isolated from the sputa of cystic fibrosis (CF) patients. Because this bacterium is not recorded in all commercial identification system databases currently available, Longitudinal study for *I. limosus* detection with a new real-time PCR has been developed.

Methods :

Real-time PCR assay with a Taqman* probe targeting the 16S rRNA gene for *I. limosus* detection in sputa from CF patients has been developed and compared in this study to the culture isolation.

Results :

From January 2006 to June 2007, 436 sputum samples recovered from 145 CF patients and 54 non-CF patients were screened blindly for the presence of *I. limosus*. Using our real-time PCR, we have detected 9 *I. limosus* positive PCR in sputa from four CF patients (2.8%) that were also culture positive in 8 cases. The minimal numbers of CFU detectable was 2 CFU/PCR.

Conclusions :

we have developed a molecular method for prompt detection of *I. limosus* with very high specificity and sensitivity. Using this screening assay, we present four additional cases of CF patients infected with this bacterium to the literature, including a 2-year-old child. In addition, using this technique we were able to detect *I. limosus* in a patient with deteriorated respiratory function three months before the culture-based isolation.

Functional studies of Vangl2 with its partner Scrib in cell migration

Edwige Belotti¹, Akanksha Gangar¹, Mireille Montcouquiol², Jean-Paul Borg¹.

1 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Pharmacologie Moléculaire, UMR 891, Institut Paoli-Calmettes, Université de la Méditerranée 27 Bd Lei Roure, 13009 Marseille, France.

2 Institut Francois Magendie, Développement en neuroscience, UMR 862, Université de Bordeaux II, 146 rue Léo-Saignat, 33077 Bordeaux Cédex, France

Planar cell polarity (PCP) is a process in which cells develop with uniform orientation within the plan of the epithelium. It plays a major role in embryonic development and uniform orientation of structures like hairs and cilia. PCP is regulated by a set of “core” genes including vangl2.

A Vangl2 mutant mouse, looptail, exhibits a severe form of neural tube defect similar to the circletail mouse, a mutant for the PDZ protein Scrib. Furthermore, a genetic interaction that assigns both proteins to a common genetic pathway has been described.

Vangl2 is a cell surface protein with four putative transmembrane domains and a C-terminal region which contains a PDZ binding motif ETSV.

In order to better characterize this poorly described protein, we performed biochemical and functional studies. We observed the ETSV-dependent interaction of Vangl2 with Scrib.

As Scrib takes part in cell migration by linking to the GIT/?PIX/PAK pathway, we studied the impact of Vangl2 in this process using mammary carcinoma T47D cells. We showed the association of Vangl2 with this complex and its localization at the leading edge. In fact, depletion of Vangl2 or overexpression of its mutant deleted of the ETSV motif inhibits cell migration. These data prove the importance of Vangl2 in cell motility together with Scrib.

Currently, we are establishing new tools to define precisely the role of the Scrib-Vangl2 complex in cancerous processes, particularly those relative to the metastatic spread.

Development of the sesamol and dry emulsion containing the association of HPMC-sucrose or sodium caseinate-sucrose by freeze-drying and spray-drying techniques

J. Alencar^{a b c}, C. Orneto^a, V. Pique^b, M. Robin^b, J.P. Galy^b, S Pietri^c, J.P. Reynier^a, P. Piccerelle^a

a Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie de Marseille, 27 Bd. Jean Moulin, 13385 Marseille, France

b Laboratoire de Chimie Fine, Université Paul Cézanne, Av. Esc. Normandie-Niemen 13397 Marseille cedex 20, France

c Laboratoire de Chimie, Biologie et Radicaux Libres, 3 Place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France.

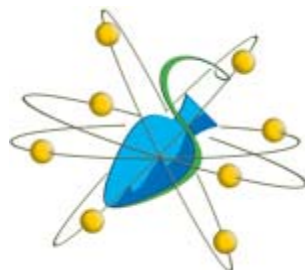
The last innovations of emulsions are formed on the dry form which are a solid form (powder or not) based on lipids from which an oil in water emulsion can be easily reconstituted when exposed to an aqueous solution or during its in vivo topical application. Different techniques have been described to prepare solid state emulsions including spray drying (Takeuchi et al., 1991a,b), solvent evaporation (Shively, 1993) and freeze-drying (Vyas et al., 1992). In this study, the influence of different formulation parameters on the characteristics of powder prepared by freeze-drying and spray-drying an oil-in-water emulsion was investigated.

Their main interest is that they address the well-know problems of physical destabilisation (flocculation, coalescence, sedimentation) of emulsions as well as of microbiological contamination of liquid forms.

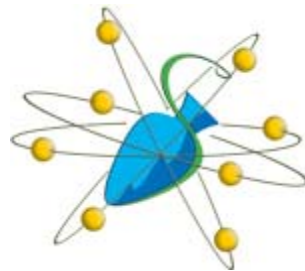
However, these forms also play an important role on the control of the drug release, notably by slowing down the release of hydrophilic active substances, and especially by improving the bioavailability of lipophilic active substances as well as drug substances needing protection against light or oxidation (Jannin and Chambin, 2005; Jang et al., 2006).

Emulsions of sesamol containing the association of HPMC-sucrose or sodium caseinate-sucrose were transformed in powder by freeze-drying and spray-drying techniques. Types of excipients were assessed during the study according to his characteristic of droplet size distribution, residual moisture, structure (RMN, DSC, Scanning Electron Microscopy Analysis) and antioxidant potential. Results introduced significant difference according to types of excipients and also between pulverized techniques.

We demonstrated that pulverized techniques and excipients types are important factors in efficacy of industrial process and antioxidant activity. The study suggests that sesamol dry emulsions developed in this work may be an alternative to other reported dry emulsion formulations, always doing attention in parameters like hydrogen bonds, temperature, interfacial tension and droplet size.



Communications par affiches



CNRS-IRD URMITE UMR CNRS 6236 – IRD 3R198
Université de la Méditerranée

**Unité de Recherche sur les Maladies
Infectieuses et Tropicales Emergentes**

Amino acid variability and drug-resistance associated substitutions within hepatitis C virus NS3 protease from protease inhibitor-naïve chronically-infected patients.

Nabil BROUK^{1,2}, Frédérique LEMBO^{1,2}, René GEROLAMI³, Catherine TAMALET^{1,2}, Philippe COLSON^{1,2}

1 CNRS-IRD URMITE UMR 6236, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille-II), 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France

2 Laboratoire de Virologie, Fédération Hospitalière de Bactériologie-Virologie Clinique, Centre Hospitalo-Universitaire Timone, 264 rue Saint-Pierre 13385, Marseille cedex 05, France

3 Service d'Hépto-Gastro-Entérologie, Centre Hospitalo-Universitaire Conception, 147 boulevard Baille, 13385 Marseille cedex 05, France

Background/Aims:

HCV NS3 protease-inhibitors (HCV-PI) currently represent a great hope for the therapeutic management of patients (pts) chronically-infected with HCV-genotype 1 strains. Indeed, these strains are the most prevalent in France and worldwide, and they are associated with high rates (>60%) of treatment failure with current therapies that include interferon-alpha and ribavirin. Promising results have been recently obtained with HCV-PI in therapeutic trials. However, the high level of HCV variability and diversity is an on-going challenge for these drugs. We aimed (i) to study the natural amino acid variability within HCV NS3 protease from HCV-PI -naïve HCV chronically-infected pts, and (ii) to detect the natural presence of amino acid substitutions previously identified as conferring reduced susceptibility to HCV-PI.

Patients/Methods:

Serum samples collected from 170 pts chronically-infected with HCV strains of known NS5b (polymerase) genotype, with known HIV-serostatus, and naïve for HCV-PI were retrospectively analyzed. Amplification then direct sequencing of the HCV NS3 protease gene were performed using in house protocols. HCV NS3 protease genotype was determined using phylogenetic analysis.

Results:

87 HCV NS3 sequences were obtained from HIV-seropositive patients, and 83 from HIV-seronegative individuals. HCV NS3 genotype was 1a from 63 pts, 1b from 38 pts, 3 from 42 pts, and 4 from 7 pts. The proportion of amino acid positions within HCV NS3 protease that harboured >5% variability was 31% (57/181) and 38% (69/181) from HIV-seropositive and seronegative patients, respectively. Mean (+/- SD) HCV amino acid variability with NS3 protease was 6.3% and 13.3%, respectively. The proportion of aa positions harbouring >20% variability was significantly lower from HIV-seropositive than from HIV-seronegative patients (10% Vs. 26%; p<0.05). The proportion of aa positions harbouring >5% variability was also significantly lower for HCV genotype 1 than genotype 3 (15% Vs. 25%; p<0.05). Amino acid substitutions associated with drug resistance were observed at positions 36 (V36M), 155 (R155K), and 168 (D168E) within HCV NS3 protease from 3 different patients. Amino acid substitutions were also found from 3 other patients within HCV NS3 protease at sites that are critical for its structure.

Conclusions:

We identified substantial amino acid variability within the NS3 protease from HCV chronically-infected patients. The level of variability differed according to the HCV genotype and the HIV serostatus. Moreover, we described the natural presence of aa substitutions conferring reduced susceptibility to HCV-PIs from patients who never received these drugs. Further studies are needed to confirm and assess the extent of primary resistance to HCV-PI, which would represent a concern for its future use.

Serological and molecular study of swine hepatitis E virus infections in Southern-France

Mamadou Kaba^{1,2}, Bernard Davoust³, Jean-Lou Marié³, Jean-Marc Rolain¹, Philippe Colson^{1,2}

¹ CNRS-IRD URMITE UMR 6236, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France

² Laboratoire de Virologie, Fédération Hospitalière de Microbiologie Clinique, Centre Hospitalo-Universitaire Timone, 264 rue Saint-Pierre 13385, Marseille cedex 05, France

³ Service de Santé des Armées, Marseille, France

Background:

Several autochthonous sporadic infections with hepatitis E virus (HEV) have been recently described in industrialized countries and a growing body of data indicates that swine might be a potential reservoir and source of infection to humans in these geographical areas. We aimed to study whether HEV is commonly present in swine in southeastern France, and to determine the relationship between sequences detected from pigs and humans.

Methods:

215 sera, 207 stools, and 107 bile samples were collected from three or six-month old pigs from different regions of southeastern France. Swine HEV IgG serology was performed by adapting the Adaltis kit. Swine HEV RNA was tested by real-time PCR and sequencing using in-house protocols.

Results:

In three-month old pigs, mean IgG anti-HEV antibodies and HEV RNA prevalence was 42% (range, 21-75%) and 65% (25-93%), respectively. In six-month old pigs, mean anti-HEV antibodies prevalence was 39%, none was HEV RNA-positive. HEV RNA was significantly more frequently detected from stools than serum (65% versus 22%; $p < 0.001$). Phylogenetic analysis showed that HEV genotype was 3f (two clusters) or 3e (one cluster), and was correlated with the swine geographical origin. Sequences were genetically-closed to HEV sequences from humans or swine found in Europe, but no phylogenetic link was found including with sequences obtained from humans in hepatitis E cases diagnosed in our laboratory.

Conclusion:

Our data indicate that three-month-old pigs from southern France might represent a potential source of contamination to humans. They also show that molecular tools might help to gain insights into HEV transmission routes and risks exposures, which is essential to adapt prevention.

Differences in the phenotypic profile of T cell subsets between Long Term Asymptomatic HIV and HIV treated patients in virological success could contribute to delay the disease progression

Corinne Brunet¹, Philippe Colson, Nathalie Bardin, Isabelle Poizot-Martin³, Isabelle Ravaux, Catherine Tamalet, Françoise Dignat-George¹

Background:

A minor proportion of HIV infected patients, termed long term asymptomatic HIV infected patients (LTA) remain healthy and immunologically stable in spite of HIV infection for more than 7 years and the absence of antiretroviral therapy. An extensive immunophenotypic pattern of markers of differentiation, functionality and activation on peripheral blood T cells has never been investigated for LTA patients. In this study, 11 LTA patients with plasma HIV-1 RNA (VL) <1,000 copies/ml were analyzed in comparison with HIV treated patients in virological success and a control group of healthy subjects using a large panel of lymphocytes markers.

Methods:

Cross-sectional analysis was performed for 11 LTA HIV-1 infected patients followed-up in Marseilles. Their VL was <1,000 copies/ml using Cobas Roche Amplicor test and an in house assay. To analyze more accurately the immune reconstitution, differentiated (CD4+/CD45RA+), functional (CD4+/CD28+) and activated (CD8+/CD38+) subsets of T lymphocytes were quantified using 3-color-flow cytometric analysis of blood samples. Results were compared to those obtained from 20 HIV-seronegative individuals and to 135 HIV-1 treated patients with HIV RNA < 2.7log₁₀ copies/ml since > 2years. Statistical analysis was performed using Kruskal Wallis test.

Results:

6/11 LTA were men; median age, 38 years. A significant difference was observed for CD4+ and CD8+T cell counts (expressed in median values) between HIV treated patients (respectively 517 and 984 cells/μl) and controls (1029 and 546). In contrast, no difference was observed between LTA (718 and 670) and HIV treated patients nor controls. Naïve CD4+ T cell counts (CD4+CD45RA+) were significantly lower in HIV treated patients (p<0.001), and in a lesser way (p<0.05) in LTA, than in control subjects. CD4+CD45RA+ cell counts were higher in LTA than in HIV treated patients, however, not significantly. CD4+CD28+ T cell count was significantly higher in LTA than in HIV treated patients (p<0.05) whereas CD8+CD38+ cell count was significantly lower in LTA patients (p<0.05). No statistical difference was observed between LTA and controls for these markers.

Conclusion:

Altogether our data showed that analysis of functional (CD4+CD28+) and activated (CD8+CD38+) T cell markers may offer the opportunity to understand the development of the protective immune responses generated in LTA patients. Together with CD4+Tcell counts, they could also be used to monitor infection and predict the disease progression.

Acquired resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole during Whipple's disease and expression of the causative target gene

Nawal Bakkali, Florence Fenollar, Silpak Biswas, Jean-Marc Rolain, and Didier Raoult

Unité des Rickettsies, CNRS URMITE 6236, IFR 48, Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille.

Background

Whipple's disease is a chronic infection caused by *Tropheryma whipplei*. Trimethoprim-sulfamethoxazole, the antibiotic recommended, is associated with failures. *T. whipplei* is resistant *in vitro* to trimethoprim as its target gene is missing.

Methods

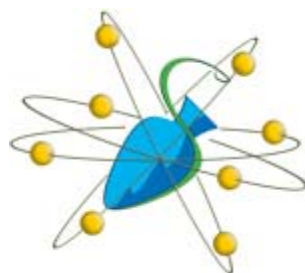
A patient experienced clinical failure during treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole. The gene encoding the dihydropteroate synthase (DHPS), the target of sulfamethoxazole, was amplified and sequenced in 20 strains and from the patient at the time of diagnosis and of failure. An *Escherichia coli* knockout strain for this gene was complemented with the sequences from a susceptible strain and from the patient with failure. Susceptibilities of complemented *E. coli* to sulfamethoxazole were tested.

Results

The target gene was identified among genes encoding a unique trifunctional enzyme, combining DHPS with the 2 preceding enzymes of the folate biosynthesis pathway. Aminoacids changes were detected in the DHPS protein sequence from the patient with failure. Gene complementation showed that the DHPS gene restored folate biosynthesis pathway and susceptibility to sulfamethoxazole, whereas the mutated sequence was associated with resistance.

Conclusions

Antibiotic susceptibility of fastidious bacteria such as *T. whipplei* can be explored by gene complementation. Mutations appear in the target gene of sulfamethoxazole during treatment making trimethoprim-sulfamethoxazole as a monotherapy.



EA 864
Université de la Méditerranée

Pharmacogénétique des Maladies Parasitaires

ÉTUDE DE PLANTES ISSUES DE LA MÉDECINE TRADITIONNELLE UTILISÉE CONTRE LE PALUDISME AUX COMORES

Ali MOHAMED KAOU⁽¹⁾, Valérie MAHIOU-LEDDÉ⁽¹⁾, Nadine AZAS⁽²⁾, Monique GASQUET⁽²⁾, Sidi AÏNOUDDINE⁽³⁾, Saïd HASSANI⁽³⁾, Ibrahim YAHAYA⁽³⁾, Evelyne OLLIVIER⁽²⁾

(1) Laboratoire de pharmacognosie-homéopathie, Faculté de Pharmacie, EA864, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05.

(2) Laboratoire de parasitologie, Faculté de Pharmacie, EA864, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05.

(3) Laboratoire de biologie, Centre National de Documentation et de Recherches Scientifiques (CNDRS), Moroni Comores.

L'Union des Comores, a fait de la lutte contre le Paludisme une priorité compte tenu de son ampleur. C'est un petit pays avec un faible niveau de vie et un accès aux soins de santé moderne difficile. L'indice plasmodique, pourcentage des sujets porteurs du parasite, en saison de pluie varie de 19 à 60 % selon les localités. Le taux d'hospitalisation pour cause de paludisme est de 69 % avec un taux de mortalité de 25 % chez les enfants de moins de 5 ans. La chimiosensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine a montré un taux d'échec thérapeutique précoce de 19 %. C'est pourquoi les plantes antipaludiques utilisées traditionnellement constituent un des meilleurs recours pour la population.

Dans le cadre de la recherche sur les plantes antipaludiques, en collaboration avec le Centre National de Documentation et de Recherches Scientifiques des Comores (CNDRS), nous avons effectué deux enquêtes ethnobotaniques sur le terrain. Dans la première, nous avons sélectionné onze plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme et des maladies parasitaires. Ces plantes, après extraction par des solvants de différentes polarités, ont subi des tests de screening sur *Plasmodium falciparum* afin de sélectionner celles qui présentent une activité antiplasmodiale *in vitro* et donc un intérêt pour une étude phytochimique. Une deuxième enquête a été réalisée en complément sur l'utilisation des deux plantes les plus actives dans les tests biologiques.

L'étude phytochimique des deux plantes sélectionnées, *Flueggea virosa* et *Piper capense*, nous a permis par un fractionnement bioguidé, d'isoler des composés des extraits les plus actifs. Les structures de ces composés ont été réalisées par Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse. L'activité de ces composés a été testée sur *Plasmodium falciparum*.

1. ADJANOHOUN, E.J. *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores*, ACCT Paris 1983.
2. AZAS N, et al., *Parasitol res. Ss.*, 2002, 165-171.
3. VAN DER HEYDER HC et al. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology.*, 1995. 2(4), 417-425
4. NYASSE B, NONO J, SONKE B, *Pharmazi* 59, 2004, 492-494

Etudes phytochimique et antimalarique des lactones sesquiterpéniques isolées de *Vernonia cinerea*

S. Bory,^a A. Chea,^a S.S. Bun,^a N. Azas,^b M. Gasquet,^b E. Ollivier,^a R. Elias^a

^a Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie de Marseille EA 864

^b Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie de Marseille EA 864

Au Cambodge, 80 % de la population, se tourne vers les thérapeutes traditionnels pour soigner les affections courantes à partir de la pharmacopée locale.

Entre 2002 – 2005, quatre enquêtes ethnobotaniques dirigées par le Pr. Cheng Sun Kain, Faculté de Pharmacie de Phnom Penh ont été réalisées dans neuf provinces du Cambodge afin d'identifier les plantes utilisées en médecine traditionnelle pour leur activité antiplasmodiale.

Des essais pharmacologiques préliminaires ont permis de retenir huit plantes dont *Vernonia cinerea* présentant une activité antiplasmodiale intéressante.

Vernonia cinerea (L.) Less. appartenant à la famille des **Asteraceae** est une plante annuelle très abondante dans tout le sud asiatique et en particulier au Cambodge.

Huit lactones sesquiterpéniques ont été isolées de l'extrait dichlorométhane préparé à partir de la plante entière. Leur structure a été déterminée par SM et RMN 1D, 2D. Deux de ces composés sont nouveaux, il s'agit des vernolides C et D et trois sont décrits pour la première fois dans la plante. L'activité antiplasmodiale *in vitro* des composés majoritaires a été évaluée sur la souche de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistante W₂.

Chen X., Zhan Z. J., Yue J. M., *Nat. Prod. Res.*, **20**, 125-129 (2006)

Dy Phon P., «Dictionnaire des plantes utilisées au Cambodge.» *Olympic, Phnom Penh*, 2000, p. 915.

Hout S., Chea A., Bun S. S., Elias R., Gasquet M., Timon-David P., Balansard G., Azas N., *J. Ethnopharmacology.*, **107**, 12-18 (2006).

Petelot A., «Les plantes médicinales du Cambodge, du Laos et du Vietnam,» *Tome II, I.D.E.O., Saigon*, 1953, p. 284.

Etude phytochimique des racines de *Cephalaria Kotschy*

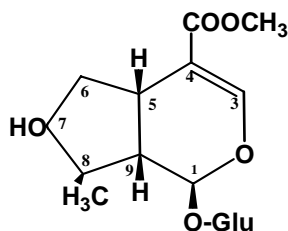
Khuraman Mustafayeva, Riad Elias, Guy Balansard, Tair Suleymanov, Valérie Mahiou-Leddet, Yusif Kerimov

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05
E-mail : xuraman_mustafayeva@yahoo.com

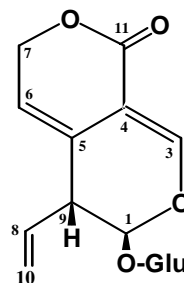
Cephalaria Kotschy (*Grossheimii*) est une plante médicinale endémique du Caucase et qui pousse en Azerbaïdjan. Les études antérieures décrivent la présence d'alcaloïdes dans les racines. L'étude phytochimique que nous avons réalisée a permis de montrer la présence d'iridoïdes.

Deux composés ont été isolés et identifiés grâce aux méthodes spectroscopiques RNM ^{13}C et ^1H , il s'agit de la loganine (1) et du gentiopicroside (2).

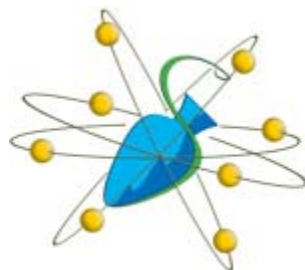
Les alcaloïdes décrits précédemment sont des artefacts obtenus lors de l'extraction de la racine en milieu ammoniacal. En effet les iridoïdes en présence d'ammoniaque se transforment en alcaloïdes. Les deux iridoïdes identifiés sont décrits pour la première fois dans les racines de cette plante.



1



2



EA 1784
Université de la Méditerranée

Biogénotoxicologie et Mutagénèse Environnementale

Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays

Assia Aouadene¹, Carole Di Giorgio¹, Luc Sarrazin², Xavier Moreau³, Laetitia De Jong³, Fabrice Garcia², Alain Thiery³, Alain Botta¹, Michel De Méo^{1*}

1 Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale, EA 1784, Université de la Méditerranée, Facultés de Médecine et Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

2 Laboratoire d'Hydrologie et de Molysmologie Aquatique, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

3 UMR-CNRS 6116 IMEP, case 17, Université de Provence, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 03, France.

The present investigation evaluated the capacity of the *Salmonella* mutagenicity test, the comet assay and the micronucleus assay to detect and characterize the genotoxic profile of river sediments. Three stations were selected on an urban river (Bouches du Rhône, France) exposed to various sources of industrial and urban pollution (StA, StB and StC) and one station on its tributary (StD). One station in a non-urban river was included (REF). The concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were determined by HPLC and the genotoxicity of the sediments was monitored by the *Salmonella* mutagenicity test (TA98 + S9, YG1041 ± S9), the comet assay and the micronucleus assay on CHO cells. Chemical analysis showed that the total PAH concentrations ranged from 23 µg.kg⁻¹ dw (REF) to 1285 µg.kg⁻¹ dw (StD). All the sediments were mutagenic in the *Salmonella* mutagenicity test. The mutagenicity was probably induced by the presence of nitroarenes (StA, StB, StC and StD) and aromatic amines (REF) as deduced from the mutagenicity profiles of strains YG1041 ± S9 and TA98 + S9. The comet assay revealed direct DNA lesions in REF, StA and StB sediments and metabolism-dependent DNA damage in StC and StD. The micronucleus assay showed an absence of clastogenicity for StA ± S9 and StC-S9, and a significant clastogenicity ± S9 for the three other stations. The genotoxicity ranking determined by the comet assay + S9 matched the ranking of total and carcinogenic PAH concentrations and this assay was found to be the most sensitive.

Effet pléiotropique du Cr(VI) sur les fibroblastes humains

W. LIU, C. BOTTA, F. CHASPOUL, M. DE MEO, P. GALLICE

EA 1784 – FR 3098 ECCOREV- Université d'Aix-Marseille - Faculté de Pharmacie- 27 Bd J Moulin – 13385
Marseille cedex 5

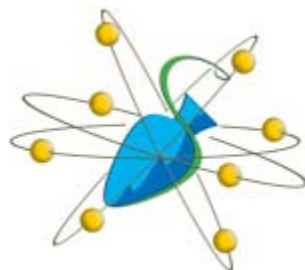
L'exposition au chrome hexavalent (Cr(VI)) induit des pathologies très diverses, telles que le cancer pulmonaire ou la dermatite de contact. Toutefois, le mécanisme d'action à l'origine de ces effets complexes reste méconnu. Dans ce domaine, nous avons montré que Cr(VI) exerce un effet délétère sur la bioénergétique cellulaire par altération de la fonction mitochondriale. Dans ce présent travail, nous avons recherché l'effet génotoxique de ce métal par la mise en œuvre du test des comètes version alcaline. L'origine des cassures de brins de l'ADN a été identifiée par l'utilisation d'une enzyme de réparation (Fpg) capable de révéler certaines lésions oxydatives des bases. En complément, la formation d'adduits Cr-ADN a été déterminée par spectrométrie de masse à plasma induit par couplage (ICP/MS).

Par le test des comètes, nous avons montré une augmentation des cassures des brins de l'ADN qui est dose-dépendante. Ces cassures sont principalement liées à un stress oxydatif. La formation d'adduits est également dose-dépendante. Enfin, il existe une corrélation entre la formation des cassures simple brin et la génération d'adduits. Ainsi donc, la génotoxicité du chrome a deux origines :

- i) Génération des cassures simples brins liées à un stress oxydatif.
- ii) Formation d'adduits

La génération de radicaux libres en présence de chrome pourrait expliquer l'atteinte mitochondriale et l'altération de la bioénergétique cellulaire précédemment observées.

L'ensemble de nos travaux montre clairement l'effet pléiotropique du Cr(VI) au niveau cellulaire.



UMR INSERM 891
Université de la Méditerranée

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

Role of the PTK7 receptor in normal and malignant haematopoiesis.

Prebet T.^{1,3}, Lhoumeau A.-C.³, Arnoulet C.², Sainty D.^{2,4}, Vey.N.^{1,4} and Borg J.-P.^{3,5}

1. Département d'Hématologie. Institut Paoli-Calmettes.
2. Département de Biopathologie. Institut Paoli-Calmettes.
3. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Pharmacologie Moléculaire, UMR891, Institut Paoli-Calmettes, Université de la Méditerranée 27 Bd Lei Roure, 13009 Marseille, France.
4. Université de la Méditerranée. UFR de Médecine.
5. Université de la Méditerranée. UFR de Pharmacie.

PTK7 is a transmembrane receptor with an extracellular domain with 7 Ig loops and a pseudo tyrosine kinase domain in the intracellular part. PTK7 has been described as a pivotal protein in embryogenesis (Lu et al, Nature 2004). In the oncology field, several reports have shown that PTK7 is overexpressed in cancers (colon carcinoma and melanoma) and especially in metastatic situations (breast cancers). Interestingly, one study suggests that PTK7 mRNA is also abundant in the most immature setting of Acute Myeloid Leukaemia (AML).

We decided to confirm and extend this observation on a larger series of haematological malignancies and to explore the potential role of PTK7 in leukemogenesis using both *in vitro* and *in vivo* experiments.

On the clinical aspects, we tested the expression of PTK7 on 135 peripheral blood or bone marrow samples from patients addressed for haematological malignancies. The flow cytometry analysis showed a strong expression of PTK7 in M1, M2 and M3 FAB subtypes. Expression of PTK7 was limited in monocytic lineage derived leukaemias. Multiple staining showed that PTK7 was significantly co-expressed with CD117 (c-Kit) but not expressed with CD11b. The expression of PTK7 was also limited in normal donor.

In vitro, we used a BaF3 leukemic cell line that expresses no detectable levels of PTK7. Flag-tagged PTK7 was expressed in this cell line and experiments have been performed to study the effect of PTK7 on cell proliferation, apoptosis and cell migration. We showed that the expression of PTK7 significantly increases the cell migration of BaF3 in Boyden chamber assays. Preliminary data on cell proliferation show a slight increase of cell proliferation in BaF3 cells expressing PTK7.

Currently, we are developing a *ptk7*^{-/-} mouse model using Embryonic Stem (ES) cells that have a gene-trapped *ptk7* gene. We will study the role of PTK7 during haematopoiesis using *in vitro* cultures, FACS analysis and transplantation experiments.

All these strategies will participate to the evaluation of PTK7 in the leukemia development. Furthermore, our study will precise if PTK7 could be considered as a potential therapeutic target in AML.

Identification of proteomic and transcriptomic predictive markers for metastatic colorectal cancer patients treated with combination cetuximab/irinotecan therapy.

Brynn Taylor Smedra^{1,7,8}, Frédéric Viret², Benjamin Esterni⁶, Pascal Finetti^{3,7,8}, Yves Toiron^{1,7,8}, Geneviève Monges^{5,7,8}, Jean Robert Delpero^{5,7}, Patrice Viens^{2,7,8}, Daniel Birnbaum^{3,7,8}, Jean-Paul Borg^{1,7,8}, François Bertucci^{2,3,6,7} and Anthony Gonçalves^{1,2,7,8}

1 Department of Molecular Pharmacology, Institut PAOLI-CALMETTES, Marseille, France

2 Department of Medical Oncology, Institut PAOLI-CALMETTES, Marseille, France

3 Department of Molecular Oncology, Institut PAOLI-CALMETTES, Marseille, France

4 Department of Biopathology, Institut PAOLI-CALMETTES, Marseille, France

5 Department of Surgical Oncology, Institut PAOLI-CALMETTES, Marseille, France

6 Department of Biostatistics, Institut PAOLI-CALMETTES, Marseille, France

7 Université de la Méditerranée, Marseille, France

8 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Pharmacologie Moléculaire, UMR891, Institut Paoli-Calmettes, Université de la Méditerranée 27 Bd Lei Roure, 13009 Marseille, France.

Cetuximab, an anti-EGFR monoclonal antibody, has demonstrated significant anti-tumor activity in a small population of metastatic colorectal cancer patients resistant to chemotherapy when administered with irinotecan. The molecular mechanism underlying clinical response or resistance to this drug is not yet understood.

In this study, seric protein profiles were generated using Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS). Our data suggest that these profiles can separate our sample group into 2 populations based on progression free survival, a low risk group and a high risk group. Further studies are underway to validate this data.

To investigate other potential predictive factors, we have also utilized transcriptional profiling. DNA microarray analysis of pre-treatment primary and metastatic tumors revealed 279 genes significantly associated with progression-free survival (PFS) ($p < 0.05$). Among these genes, we identified two putative markers of cancer stem cells, ALDH1 and CD44. Validation of protein expression by immunohistochemistry is ongoing. In addition, a 5-gene signature was identified that classified the patients into “low-risk” and “high-risk” groups and included UBQLN1, AK3, ARPC5L, C9orf32 and CDC16. In leave-one-out validation, the median PFS of the predicted “high-risk” group and predicted “low-risk” group were 2.4 and 6.0 months respectively ($p < 0.0001$, log rank test).

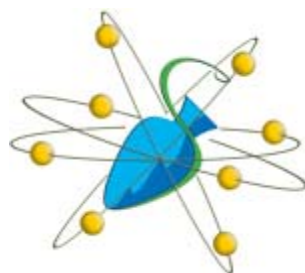
Scrib regulates PAK activity during the cell migration process

Sébastien Nola¹, Michaël Sebbagh¹, Stéphane Audebert¹, Jean-Paul Borg^{1,2} and Marie-Josée Santoni¹

¹*Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille UMR 891 Inserm, Institut Paoli-Calmettes, Université de la Méditerranée;* ²*Faculté de Pharmacie de Marseille*

The PDZ protein Scrib is described for its crucial role in the proper development of Metazoans. At the cellular level, deficiency in Scrib has a profound effect in many aspects of cell polarity and cell movement although it remains unclear how it acts in these processes. In human cell lines, we identified that Scrib belongs to a tripartite complex containing β PIX, a Guanine Exchange Factor for Rac and Cdc42, and GIT1, a GTPase Activating Protein for Arf6. This complex is involved in receptor recycling and vesicle exocytosis.

Our current study in mammary carcinoma cell line T47D shows that the oncogenic serine-threonine kinase PAK associates with Scrib and β PIX and that Scrib, β PIX and PAK are located at the leading edge of migratory cells. Using RNA interference and dominant-negative constructs, we demonstrate that members of this protein complex are required for epithelial cells to properly respond to a chemoattractant stimulus. Loss of Scrib most likely impairs cell migration by disrupting the correct positioning of β PIX and PAK at the plasma membrane which leads to incomplete PAK activation. These data provide evidence that PAK is a member of the Scrib complex and that the Scrib/ β PIX/PAK signalling machinery is required for epithelial cell migration under chemoattractant cues.



UMR CNRS 6264
Université de la Méditerranée

Laboratoire Chimie Provence (LCP)
Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LCPR)

TARGETING KINASES : PREPARATION OF 4-ARYLQUINAZOLINE DERIVATIVES

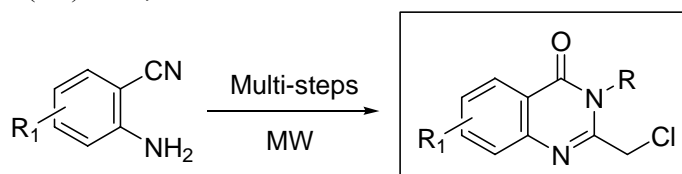
Youssef KABRI¹, Armand GELLIS¹, Hervé KOVACIC², Patrice VANELLE¹

(1) Laboratoire Chimie Provence, UMR CNRS 6264 Université d'Aix-Marseille I, II et III, Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire LPCR, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

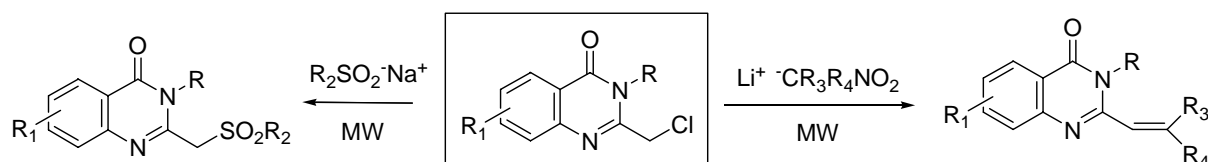
(2) Laboratoire de Biophysique, UMR INSERM 911 Université de la Méditerranée, 27 bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France.

Protein tyrosine kinases are enzymes that provide a central switch mechanism in cellular signal transduction pathways. As such they are involved in many cellular processes such as cell proliferation, metabolism, survival and apoptosis. Several protein tyrosine kinases are known to be activated in cancer cells and to drive tumour growth and progression.

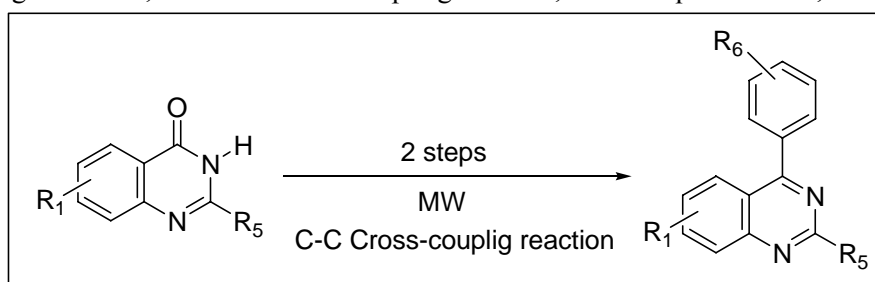
Among the different medicinal properties presented by some quinazoline derivatives, the most interesting clinical application was developed in oncology.¹ Effectively, molecules such as gefitinib (Iressa[®]) are known to be efficient tyrosine kinase inhibitors. The interest of the quinazoline derivatives for medicinal chemistry led us to develop the synthesis of new quinazolin-4(3*H*)-ones, under microwave irradiation.



After obtaining the chloromethyl derivatives in 4 steps, their reactivity was studied under microwave irradiation, with nitronate anions and various other anions centred on a sulfur heteroatom.



These intermediates give access, *via* a C-C cross-coupling reaction,² to new quinazolines, substituted in position 4.



Study of biological properties of the prepared compounds is under investigation.

¹ Lipunova, G. N. *Pharm. Chem. J.*, **2000**, 34(1), 19-22

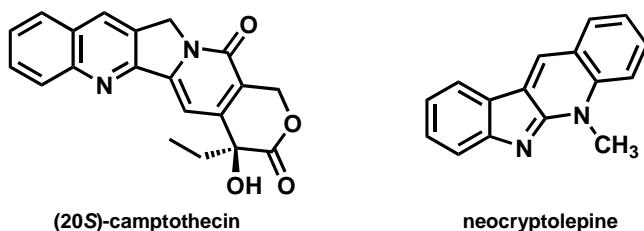
² Flanagan, S. P. ; Goddard, R. ; Guiry, P. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 9808-9821.

TDAE STRATEGY FOR THE SYNTHESIS OF NEW POLYCYCLIC IMIDAZOTHIAZOLE DERIVATIVES

Thierry JUSPIN, Marc MONTANA, Thierry TERME and Patrice VANELLE

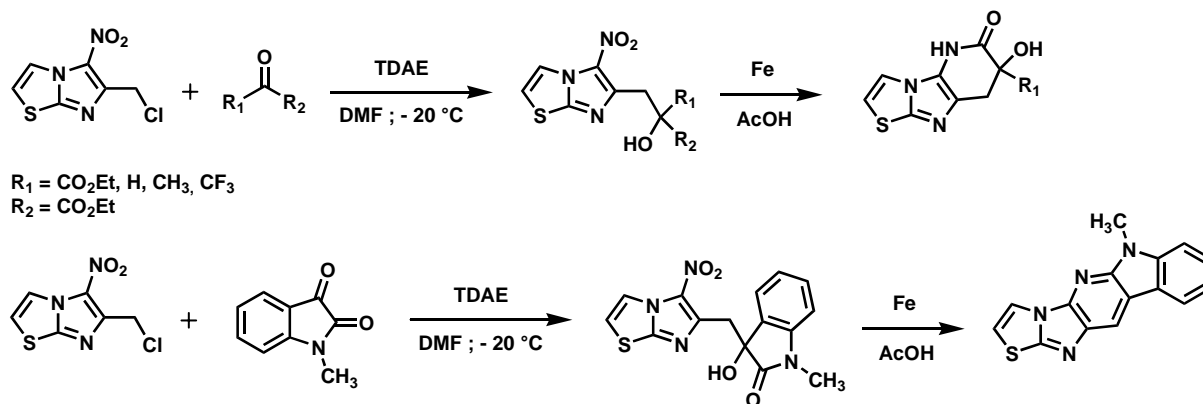
Laboratoire Chimie Provence, UMR CNRS 6264 Université d'Aix-Marseille I, II et III, Laboratoire de Pharmaco Chimie Radicale LPCR, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

Considerable interest arose for the total synthesis of polyheteroaromatic alkaloids,¹ mostly due to their potential efficiency in medical treatments, like the potent antitumor activities of the camptothecin family of alkaloids or the strong antiplasmodial activity of neocryptolepine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* strains.²



The interesting biological activities have stimulated a surge of interest in developing new synthetic pathways to polyheteroatomic ring systems. Among them, the TDAE methodology followed by a reduction-cyclisation reaction presents a rapid access to tri-, tetra- and pentacyclic derivatives.³

In continuation of our program directed toward the study of single electron transfer reactions of bioreductive alkylating agents⁴ and the preparation of new potentially bioactive compounds as anticancer agents, we report herein an original access to highly functionalized polyaromatic compounds using TDAE methodology in imidazothiazole series.



References :

- (a) Kansal, V. K.; Potier, P. *Tetrahedron* 1986, 42, 2389. (b) Devarj, R.; Cushman, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 369.
- Cimanga, K.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Turger, C. A. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 688.
- (a) Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Vanelle, P. *Synlett* 2005, 251. (b) Amiri-Attou, O.; Terme, T.; Vanelle, P. *Synlett* 2005, 3047.
- (a) Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 6433-6435. (b) Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 5121-5124. (c) Amiri-Attou, O.; Terme, T.; Vanelle, P. *Molecules* 2005, 10, 545-551. (d) Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 8373-8376. (e) Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 6573-6576. (f) Amiri-Attou, O.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 1016-1020.

TARGETING 5-HT RECEPTORS: TDAE APPROACH IN BENZODIOXOLE SERIES

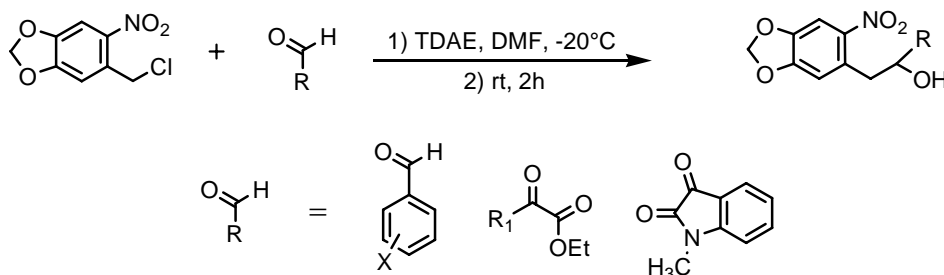
Marc Since,^a Ouassila Amiri-Attou,^a Aurélien Lesnard,^b Jana Sopkova,^b Thierry Terme,^a François Dauphin,^b Sylvain Rault^b and Patrice Vanelle^a

^a Laboratoire Chimie Provence, UMR CNRS 6264 Université d'Aix-Marseille I, II et III, Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire LPCR, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

^b CERMN, 5 rue vaubénard, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Caen, 14032 Caen cedex, France

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neurotransmitter that exerts its effects on the central and peripheral nervous system by interacting with a large variety of receptors. Since the past decades, considerable attention has been centered on the identification of agents which act selectively at each of these receptor subtypes because of the wide range of physiological systems and pathologic conditions in which 5-HT is known to play a role.

We have recently shown that from *o*- and *p*-nitrobenzyl chloride, Tetrakis(Dimethyl-Amino)Ethylene (TDAE) could generate a nitrobenzyl carbanion which is able to react with various electrophiles as aromatic aldehydes, α -keto esters, ketomalonate and α -keto lactam derivatives.¹⁻⁶ In continuation of our program directed toward the study of single electron transfer reactions of bioreductive alkylating agents and the preparation of new potentially bioactive compounds in the CNS area, we report herein an original access to highly functionalized benzodioxoles.



The results of the primary evaluation on 5-HT_{1a}, 5-HT₄, 5-HT_{5a}, 5-HT₆, 5-HT₇ serotonin receptors of synthesized benzodioxoles will be presented.

1 Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6433-6435.

2 Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 5121-5124.

3 Amiri-Attou, O.; Terme, T.; Vanelle, P. *Molecules* **2005**, 10, 545-551.

4 Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 8373-8376.

5 Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6573-6576.

6 Amiri-Attou, O.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 1016-1020.

MICROWAVE ASSISTED DOUBLE SUZUKI-MIYAUURA REACTION IN IMIDAZO[1,2-*a*]PYRIDINE SERIES : SEROTONINERGIC GOALS

Rémi Szabo,¹ Maxime D. Crozet,¹ Caroline Castera-Ducros,¹ Sabrina Gueulle,² Sylvain Rault,² François Dauphin,² Patrice Vanelle.¹

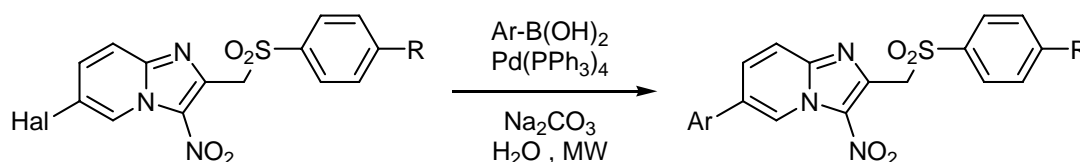
¹ Laboratoire Chimie Provence, UMR CNRS 6264 Université d'Aix-Marseille I, II et III, Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire LPCR, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

² Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, UPRES-EA 3915, Université de Caen, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 5 rue Vaubénard, 14032 Caen Cedex, France.

Imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives are currently the object of a renewed interest in the pharmaceutical field.¹ Lately, many publications have reported on their pharmacological properties in a large range of biological activities. But it is especially in the field of the central nervous system that the activity of this skeleton appears most important today, contributing in particular to a better comprehension of the mechanism of action of the psychotropic drugs.²

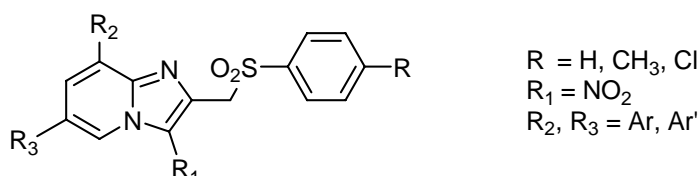
In our previous studies^{3,4}, we focused on microwave assisted Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions in aqueous medium on 2-arylsulfonylmethyl-6-halo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives.

Some of these compounds presented affinities with some serotonin receptor subtypes.



More recently, we developed a microwave assisted double Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction on 2-arylsulfonylmethyl-6,8-dibromo-3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives.⁵

Using these methodologies, we made a series of highly functionalized molecules:



The first obtained double cross-coupled imidazo[1,2-*a*]pyridines as well as methodology used will be presented. Biological evaluation on the serotonergic system will also be discussed.

^[1] Kazock, J.-Y. ; Enguehard-Gueiffier, C. ; Théry, I. ; Gueiffier, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, 78, 154-159.

^[2] George, P. ; Allen, J. *Eur. Patent* 267 111, 11.05.1988 (*Chem. Abstr.* **1988**, 109, 149531a.)

^[3] Kotha, S. ; Lahiri, K. ; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9633-9695.

^[4] Enguehard, C. ; Hervet, M. ; Théry, I. ; Renou, J.-L. ; Fauvelle, F. ; Gueiffier, A. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, 84, 3610-3615.

^[5] Szabo, R. ; Crozet, M. D. ; Vanelle, P. *Synthesis* **2008**, 1, 127-135.

ANTIPLASMODIAL PHARMACOMODULATION IN QUINAZOLINE SERIES

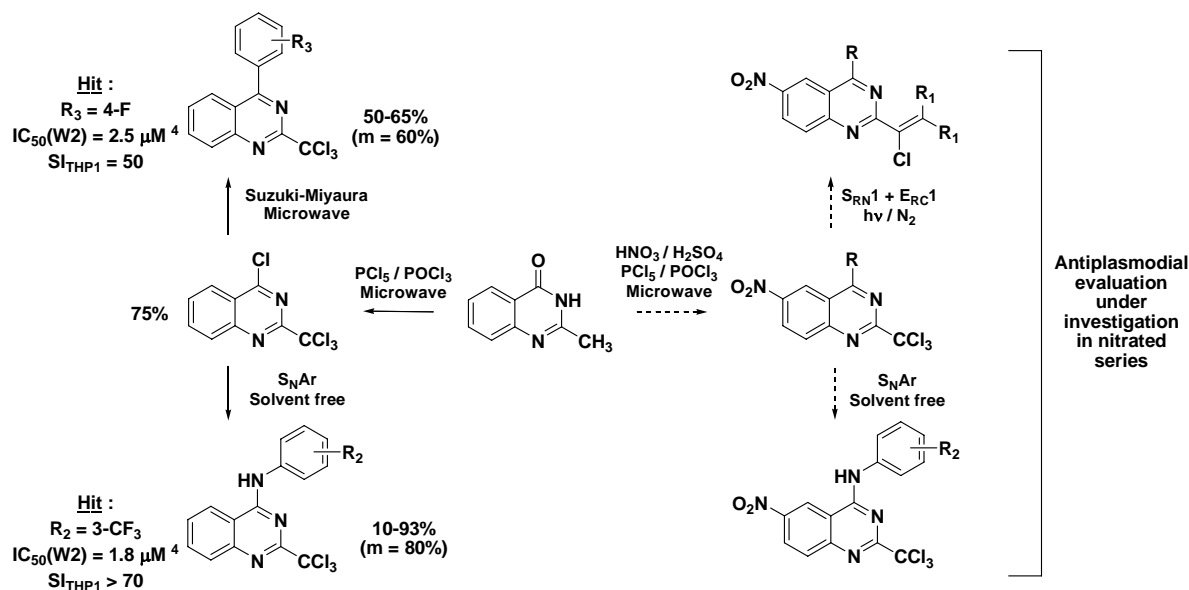
P. Verhaeghe,^a N. Azas,^b M. Gasquet,^b S. Hutter,^b M. Laget,^c J-P. Reboul,^a C. Castera-Ducros,^a M. Maillard-Boyer,^a S. Rault,^d P. Rathelot^a and P. Vanelle^{a*}

^aLaboratoire Chimie Provence, UMR CNRS 6264 Université d'Aix-Marseille I, II et III, Laboratoire de Pharmacochimie Radicalaire LPCR, Faculté de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France,

^bLaboratoire de Parasitologie, EA 864, ^cLaboratoire de Microbiologie, EA 864, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

^dCentre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, UPRES EA 3915, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Caen Basse-Normandie, 5 rue Vaubénard, 14032, Caen cedex, France.

This work aims at improving the *in vitro* antiplasmodial activity (W2 chloroquino-resistant *Plasmodium falciparum* strain) of quinazoline derivatives. It is based on significant results obtained in 4-aryl-2-trichloromethylquinazoline series¹, prepared through combined microwave-assisted chlorination² and Suzuki-Miyaura cross coupling reactions.¹ The replacement of the aryl group, in position 4 of the quinazoline ring by some substituted anilines decreases the IC₅₀ value of the corresponding molecules and increases the selectivity index (SI) toward the THP1 human monocyte cell line.³ The antiplasmodial profile of both nitrated analogues and 2-vinyl chloride-substituted quinazolines, guided with a QSAR approach, has led to very promising initial results.

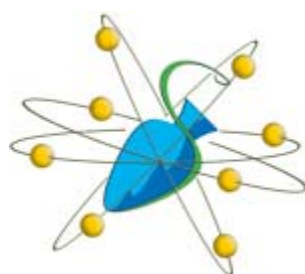


¹ P. Verhaeghe, N. Azas, M. Gasquet, S. Hutter, C. Ducros, M. Laget, S. Rault, P. Rathelot, P. Vanelle, *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 396-401

² P. Verhaeghe, P. Rathelot, A. Gellis, S. Rault and P. Vanelle, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 8173-8176.

³ P. Verhaeghe, N. Azas, M. Gasquet, S. Hutter, M. Laget, J-P. Reboul, C. Castera-Ducros, S. Rault, P. Rathelot, P. Vanelle, submitted to *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**.

⁴ IC₅₀ (W2) of Chloroquine (Nivaquine[®]) = 0.7 μM / SI_{THP1} = 57.



UMR INSERM 476 - INRA 1260
Université de la Méditerranée

Nutriments lipidiques
& prévention des maladies métaboliques

Détermination de la leptinémie dans une population de référence.

Lorec-Penet AM^{1,2,3,4,5}, Nicolay A^{1,2,3,4,5}, Beccaria J⁴, Lombard E^{1,2,3,4,5}, Portugal H^{1,2,3,4,5}

¹ INRA, UMR1260 «Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques», Marseille, F-13385 France.

² INSERM, U476, Marseille, F-13385 France.

³ Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, IPHM-IFR 125, Marseille, F-13385 France.

⁴ Hôpital Ste Marguerite, 270 BD Ste Marguerite, 13009 Marseille,

⁵ Centre ARCOL Marseille Provence.

La détermination de la leptinémie s'avère aujourd'hui être un marqueur important de la réponse immunitaire et de l'inflammation chez l'homme.

En effet, la leptine, possède des actions sur le système nerveux central (anorexigène), sur la régulation du métabolisme osseux, la modulation du système immunitaire (augmente les taux d'IL1, IL2, IL 6, IL12, de TNF α , la prolifération des monocytes, ...). Par ailleurs, la leptine possède une action directe sur les cellules β du pancréas en diminuant la sécrétion d'insuline.

La leptine devrait être dans l'avenir un paramètre de surveillance de sujets à risque (obèses, syndrome métabolique, diabétiques, ...).

Il est indispensable que des valeurs de référence soient déterminées sur une population témoin de volontaires sains.

Une cohorte de 82 sujets (28 hommes et 54 femmes) d'âge moyen $39,9 \pm 13,3$ ans pour lesquels le bilan biologique incluant la glycémie, l'insulinémie, le bilan lipidique élargie aux apolipoprotéines A1, B100, B48, CII et CIII, a été exploré.

Une relation linéaire significative a été mise en évidence entre l'indice de masse corporelle et la leptinémie en fonction du sexe.

La leptinémie possède une distribution log-normale et est globalement deux fois plus élevée chez la femme ($11,9 \pm 9,1$ ng/ml) que chez l'homme ($4,7 \pm 4,9$ ng/ml).

Etude des allergènes dans les produits cosmétiques par CPG/SM

K. Fattarsi, I. Bouhlel, C. Mikail, L. Abou, M.F Vergnes, A. Nicolay, H. Portugal, J. Kaloustian*

Laboratoire de Chimie Analytique, Qualitologie, Nutrition, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Boulevard J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

* Courriel : Jacques.Kaloustian@pharmacie.univ-mrs.fr

L'utilisation accrue des parfums, d'huiles essentielles et d'extraits de plantes dans les produits cosmétiques a entraîné une augmentation des cas d'allergie de contact. De plus, certains produits domestiques (produits d'entretien) contenant des fragrances sont la cause de l'augmentation des cas d'eczéma des mains.

Toutes ces observations ont conduit la Communauté Européenne à prendre une directive (7^{ème} amendement) pour l'étiquetage obligatoire de 26 allergènes éventuellement présents, pour chacun, d'une part à plus de 100 ppm dans le cas des produits cosmétiques rincés, et d'autre part à plus de 10 ppm pour ceux non rincés.

Le but de ce travail est de rechercher et éventuellement doser les 24 molécules volatiles sur les 26 produits, éventuellement présentes d'une part dans les matières premières destinées à la cosmétique et d'autre part dans des produits cosmétiques.

Un plan d'expérience a été développé en Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse. Il a permis une très bonne séparation des pics des allergènes étudiés (résolution supérieure à 1,5 dans tous les cas). La limite de détection et la limite de quantification sont respectivement inférieures à 0,35 mg/L et à 0,90 mg/L (sauf pour l'alcool amylocinnamique 0,45 et 1,40 mg/L).

Dans le but de réaliser le dosage des allergènes dans des échantillons à analyser, la méthode à l'étalonnage interne a été développée avec la réalisation de gammes d'étalonnage (six solutions étalons entre 1 et 10 mg/L) contenant chacune 8 mg/L de deux étalons internes (tétradécane et hexadécane). Le calcul des équations des droites d'étalonnage a été effectué. Le coefficient de corrélation est supérieur à 0,986 dans tous les cas.

Composition chimique de l'huile essentielle de *Vanillomopsis erythropapa*

L. Abou, C. Mikail, M.F Vergnes, A. Nicolay, H. Portugal, J. Kaloustian*

Laboratoire de Chimie Analytique, Qualitologie, Nutrition, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Boulevard J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

* Courriel : Jacques.Kaloustian@pharmacie.univ-mrs.fr

Le *Vanillomopsis erythropapa* (Candeia Tree), de la famille des Asteraceae, est un petit arbre de la savane brésilienne aux fleurs blanches et à l'écorce épaisse. Cette dernière contient une huile essentielle riche en α -bisabolol. Ce composé est depuis longtemps utilisé en thérapeutique pour lutter contre les inflammations. Il entre aussi dans la composition de produits cosmétiques pour ses propriétés apaisantes.

L'analyse chimique de l'huile essentielle, par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse, a permis d'identifier le β -bisabolène, l' α -humulène et l' α -bisabolol, et de les quantifier grâce aux méthodes de dosage par normalisation interne et par étalonnage interne. Les teneurs sont respectivement de 1,8 %, de 2,4 % et de 95,8 %.

Par ailleurs, la répétabilité a été réalisée sur le temps de rétention et la teneur en α -bisabolol dans l'huile essentielle analysée. Les coefficients de variation sont excellents et respectivement de 0,025 % et de 1,13 %.

AMELIORATION DES SUPPLEMENTS PANCREATIQUES PAR MODIFICATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA LIPASE PANCREATIQUE

Colin D., Allouche M., Sebban-Kreuzer C., Crenon I. et Kerfelec B.

UMR INSERM 476-INRA 1260, Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Chez les patients atteints de mucoviscidose, une insuffisance pancréatique est très souvent observée entraînant, entre autre, une malabsorption des graisses liée à une déficience en lipase pancréatique. Les suppléments en lipase pancréatique administrés actuellement ne permettent pas de normaliser la digestion des lipides en raison d'un pH intestinal acide défavorable à l'action de la lipase.

L'acidité du milieu a une répercussion directe sur l'activité de la lipase car, comme les estérases à sérine, son activité dépend de la déprotonation de l'histidine catalytique (1). Mais elle a également un effet négatif sur la stabilité de l'enzyme en présence de ses partenaires de lipolyse, comme nous l'avons montré précédemment. De plus, des travaux récents (2) montrent que le pH pourrait avoir un effet sur l'affinité des lipases pour leurs substrats.

Notre objectif est de modifier les propriétés physico-chimiques de la lipase afin de permettre à cette enzyme de fonctionner dans les conditions duodénales particulières de patients atteints de mucoviscidose, dans le but d'améliorer leur statut nutritionnel. Une première série de mutations portant sur des résidus proches de l'histidine catalytique a été réalisée par mutagenèse dirigée afin d'augmenter le potentiel électrostatique négatif du centre actif et ainsi déplacer le pH optimum vers des valeurs plus acides.

Les mutants H151E, H151A, Y114F, L264E ont été exprimés dans les cellules d'insectes, purifiés et caractérisés. La lipase mutée en position 114 présente des propriétés (stabilité, affinité colipase et effet des sels biliaires) très similaires à celles de la lipase native. Le profil d'activité en fonction du pH réalisé par chromatographie sur couche mince montre que ce mutant est aussi actif voire plus que la lipase native à pH5,5 et 6,5, bien qu'il ne possède que 50% de l'activité à pH7,5. La mutation en position 264 affecte de façon significative l'activité du mutant à pH7,5 mais également la capacité de la colipase à restaurer l'activité de la lipase en présence de sels biliaires. Il est intéressant cependant de constater que le pH n'a que peu d'influence sur l'activité de ce mutant, celui-ci étant aussi actif à pH4 qu'à pH7,5.

Parallèlement à cette approche, nous développons un programme de mutagenèse aléatoire permettant de générer un grand nombre de mutants mais qui nécessite une étape de criblage rapide qui se révèle, pour l'instant, critique.

Ce travail fait l'objet d'un soutien par l'Association Vaincre la Mucoviscidose.

¹Neves-Petersen MT, Petersen EI, Fojan P, Noronha M, Madsen RG, Petersen SB (2001) *J. Biotechnol.* 87, 225-254.

²H. Chahinian, T. Snabe, C. Attias, P. Fojan, S.B. Petersen, and F. Carrière, (2006) *Biochemistry*, 45, 993-1001.

ETUDE DES INTERACTION DE LA LIPASE PANCREATIQUE ET L'INTERFACE LIPIDIQUE

Maya ALLOUCHE⁽¹⁾, Damien Colin⁽¹⁾, Annick THOMAS⁽²⁾, Frédéric BAYSN⁽²⁾, Robert BRASSEUR⁽²⁾, Brigitte KERFELEC⁽¹⁾.

(1) UMR Inserm 476-Inra 1260, Faculté de Médecine 13385, Marseille, France, Maya.Allouche@medecine.univ-mrs.fr

(2) Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Faculté Agronomique, 5030 Gembloux, Belgique, thomas.a@fsagx.ac.be

Le système lipase-colipase pancréatique, système clé de la digestion des triglycérides alimentaires. Au niveau intestinal, ces triglycérides sont sous forme de globules lipidiques tapissés d'une monocouche de molécules amphiphiles. L'efficacité de ce système repose sur des effets d'orientation lipase/colipase/interface lipidique, réalisant une catalyse hétérogène, où la lipase est soumise à un phénomène d'activation. Lors de cette activation, la lipase subit un changement de conformation impliquant le déplacement d'un bras démasquant le centre actif et un site d'interaction avec l'interface. Pour comprendre le système, nous avons étudié l'implication de peptides obliques dans ces mécanismes.

Ce sont des fragments de 10 à 20 résidus structurés en hélice α , ils possèdent un gradient d'hydrophobicité asymétrique qui leur confère une orientation oblique par rapport à une interface lipidique. Ces peptides sont impliqués dans la déstabilisation d'interfaces hydrophobes/hydrophiles. Des études de modélisation moléculaire sur la lipase pancréatique humaine prédisent la présence de plusieurs peptides obliques dont un, le fragment [240-252], localisé dans le bras. Des mutations sont réalisées dans cette région pour perdre l'orientation oblique. Nous avons montré que lors de la transformation de la séquence [240-252] en hélice amphipatique classique, l'efficacité catalytique de la lipase en présence de micelles de sels biliaires diminue significativement. Ce résultat pourrait s'expliquer par une diminution de la mobilité du bras. Nous proposons que l'incapacité de la séquence [240-252] à se stabiliser en présence d'une interface lipidique soit essentielle pour une efficacité catalytique maximale. Des études complémentaires par Microscopie à l'Angle de Brewster sont réalisées pour déterminer le rôle de la colipase dans l'interaction de la lipase à l'interface lipidique.

¹ Hermoso J, Pignol D, Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C and Fontecilla-Camps, J. JBC, **1996**, 271, 18007-18016

² Brasseur, R, Mol Memb Biol, **2000**, 17, 31-40.

La phlorétine augmente la différenciation adipocytaire et l'expression de l'adiponectine.

M. Hassan^{1,2}, J.F. Landrier¹, C. El Yazidi¹, H. François², A. Margotat¹ and M.J. Amiot¹.

¹UMR INSERM 476 / INRA 1260, Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France

²ANDROS & Cie, BP 1 46130 Biars sur Cere, France

Plusieurs études épidémiologiques ont associé la consommation de pommes à une réduction de la prévalence de certains cancers, maladies cardiovasculaires et diabète de type II (Boyer *et al.* 2004 Nutr J). Cet effet pourrait être lié à la composition qualitative et quantitative en composés phénoliques.

Dans cette optique, nous avons évalué l'effet de la phlorétine, une dihydrochalcone retrouvée dans les pommes, sur la différenciation adipocytaire et sur l'expression de l'adipokines, deux événements centraux dans le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance.

Les préadipocytes 3T3-L1 ont été cultivés pendant 12 jours en présence ou non de phlorétine. Les taux d'ARNm ont été déterminés par PCR quantitative et la sécrétion d'adiponectine a été mesurée par ELISA.

L'induction des facteurs de transcription C/EBP α et PPAR γ , caractéristique de la différenciation adipocytaire, s'est trouvée potentialisée par la phlorétine. De même, l'accumulation de triglycérides a été doublée dans les cellules cultivées en présence de phlorétine.

Une induction de l'expression de l'adiponectine (ARNm et protéine) a été mise en évidence. Cette régulation peut s'expliquer en partie du fait de l'induction de PPAR γ , sous l'effet de la phlorétine. Nous avons également montré que la phlorétine est capable de transactiver le récepteur nucléaire PPAR γ . Ce mécanisme, déjà rapporté pour d'autres polyphénols, constitue un niveau supplémentaire de régulation.

En conclusion, ces données montrent que la phlorétine induit la différenciation adipocytaire et l'expression de l'adiponectine. De telles modifications de l'expression des adipokines et des facteurs de transcription pourraient représenter un effet bénéfique en termes de prévalence de l'obésité et de l'insulino-résistance.

MODULATION DE L'EXPRESSION ENTEROCYTAIRE DE AHR (RECEPTEUR AUX DIOXINES) PAR L'INFLAMMATION

VILLARD Pierre-Henri, KHARBOUTLY Hoda, SEREE Eric, CHAMPION Serge, FOUCHIER Francis et BARRA Yves

UMR INSERM 476 INRA 1260 – Faculté de Médecine, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05-France

Nous sommes exposés au travers de notre alimentation à des composés qui en activant ou en réprimant certains facteurs de transcription, vont pouvoir moduler la physiologie des entérocytes. Nous avons ainsi démontré que l'exposition des cellules Caco2 (lignée entérocytaire humaine) à des ligands du facteur de transcription AhR, tels les HAPs, conduisait à une induction de l'expression de cytokines proinflammatoires TNF α et IL1 β .

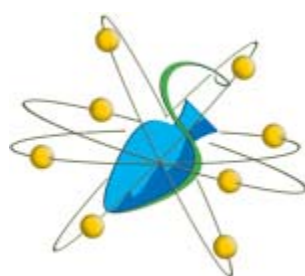
L'objectif de cette étude était d'évaluer si l'inflammation était elle même susceptible de moduler l'expression de AhR.

Des cellules Caco-2 ont ainsi été traitées par un composé pro-inflammatoire, le PMA.

Ce traitement se traduit par une augmentation du taux de transcrits de diverses cytokines (TNF α , IL1 β , IL8, TGF β), mais également de AhR. Au moyen de la technique des gènes reporteurs, nous avons démontré l'origine transcriptionnelle de cette induction de l'expression de AhR.

Le PMA est connu pour activer les deux voies majeures de l'inflammation, médiées respectivement par AP1 et NF κ B. L'analyse informatique du promoteur de AhR révèle la présence de sites de fixation potentiels de AP1 et NF κ B. La mutagenèse dirigée des sites AP1 n'a eu aucun effet sur l'activation du promoteur de AhR par le PMA, contrairement à celle réalisée sur les sites NF κ B.

En conclusion, nos résultats montrent que l'inflammation est susceptible d'induire, via NF κ B, l'expression de AhR. Sachant que l'activation de AhR se traduit par une induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoire, AhR pourrait donc être à l'origine d'une boucle inflammatoire.



UMR INSERM 911
Université de la Méditerranée

**Centre de Recherche en Oncologie biologique et
Oncopharmacologie (CRO2)**

Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*

Soazig Douillard Malesinski, Vincent Peyrot, Nicolas Vidal, Sebastien Combes, Jean-Pierre Finet,
*CRO2 INSERM U911 et Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385
Marseille Cedex 5, France*

*UMR 6517 CNRS et Aix-Marseille Université, 'Chimie, Biologie et Radicaux Libres' Faculté des Sciences St
Jérôme, case 521, 13397 Marseille Cedex 20, France*

*Sujittra Deesamer, Udom Kokpol, Warinthorn Chavasiri, Natural Products Research Unit, Department of
Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract

Mucronulatol 1 and violanone 2 isolated from *Dalbergia oliveri* Gamble, and the corresponding isoflavone 3 were prepared by ligand coupling reactions involving organolead reagent. Biological studies have shown a significant cytotoxic effect against HBL100 leukemia cell line only for isoflavan 1 with an IC₅₀ value of 5.7mM. All the drugs modestly inhibit the invitro microtubule assembly, independently of the cytotoxic ability. Natural compounds 1 and 2 have no antibacterial activity, but are potent inhibitors of the *Fusarium oysporum* phytopathogenic fungal growth.

Modulation redox de l'efficacité de l'association Oxaliplatine/Cetuximab in vitro.

Dahan Laetitia¹, Sadok Amine¹, Braguer Diane¹, Seitz Jean François² and Hervé Kovacic¹

¹Inserm UMR 911, ²Service d'oncologie digestive, CHU Timone. Marseille Université France.

L'oxaliplatine est une drogue majeure utilisée dans le cancer colorectal, et le cetuximab (anticorps monoclonal chimérique anti EGF récepteur) est indiqué en deuxième ligne en association à l'irinotécan. Nous avons évalué in vitro l'association Oxaliplatine/Cetuximab sachant que ces deux molécules ne sont pas encore combinées en pratique courante. Les NADPH oxydases (Nox) et plus particulièrement Nox1 préférentiellement exprimé dans le colon et activé par Ras, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont les superoxydes. Les superoxydes peuvent moduler l'effet de certains agents anticancéreux et la deuxième partie de ce travail évalue l'implication du stress oxydatif sur cette combinaison pharmacologique. Nous avons travaillé sur 3 lignées cellulaires de cancer colique exprimant l'EGF récepteur (HT29-D4, Caco-2 et SW480) et une ne l'exprimant pas (SW620). Parmi ces lignées SW480 et SW620 sont mutées sur Ras. Les tests de cytotoxicité ont été réalisés par MTT. Les ROS ont été mesurés par WST1 et Lucigénine pour les superoxydes et par DCF-DA pour le peroxyde d'hydrogène. L'expression du récepteur à l'EGF sur ces lignées a été confirmée par western blot et cytométrie de flux.

L'Oxaliplatine en association au Cetuximab est antagoniste sur les deux lignées cellulaires testées exprimant l'EGF récepteur et non mutées sur Ras (HT29-D4 et Caco-2) : il existe une élévation significative des IC50 lorsque le Cetuximab est combiné à l'Oxaliplatine par rapport aux cellules traitées par Oxaliplatine seule. En revanche la voie de l'EGF n'intervient pas sur la lignée n'exprimant pas le récepteur (SW620) ou celle l'exprimant mais mutée sur Ras (SW480). Les mesures de ROS ont montrées une diminution significative de la production de ROS par le Cetuximab, et une diminution dose dépendante des ions superoxydes avec augmentation dose dépendante du peroxyde d'hydrogène sous Oxaliplatine.

Par ailleurs l'inhibition de Nox1 par un agent pharmacologique (apocynine) ou par un shRNA spécifique entraîne une diminution d'efficacité de l'Oxaliplatine sur HT29-D4 et Caco-2 mais pas sur SW620 ou SW480. Il existe un antagonisme in vitro de l'Oxaliplatine et du Cetuximab qui implique les ROS de Nox1. L'efficacité du Cetuximab est médiée par l'ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) et par des effets directs sur les cellules tumorales. Une meilleure compréhension du rôle de Nox1 dans l'antagonisme retrouvé au niveau cellulaire permettrait d'améliorer l'efficacité de cette combinaison.

Correspondance : hkovacic@univmed.fr

La NADPH oxydase Nox1 contrôle la persistance de migration par un switch de l'expression membranaire des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ dépendant de la voie Rho/Rock.

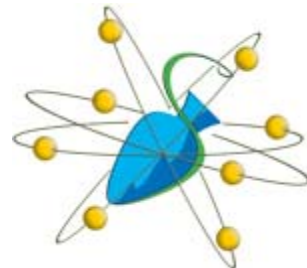
Amine Sadok¹, Anne Pierres², Charles Prevost¹, Maxime Lehmann¹, Hervé Kovacic¹

¹UMR INSERM 911 CRO2, ²INSERM UMR S 600, Aix-Marseille Université, France.

La migration cellulaire polarisée est une étape fondamentale dans le développement du phénotype tumoral. Le rôle spécifique des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la régulation de la dynamique migratoire est un concept émergent. Outre le système mitochondrial, la NADPH oxydase 1 (Nox1) est une source majeure de la production superoxydes dans les cancers coliques. Nous avons récemment mis en évidence, dans deux lignées d'adénocarcinomes coliques, une activation du système Nox1 au cours de l'adhérence cellulaire sur collagène I (Col-I). Cette activation transitoire de la production de ROS après la phase d'étalement, est régulée à la fois par la RhoGTPase Rac1 et par le métabolisme de l'acide arachidonique (De Carvalho DD *et al*, Int. J. Cancer, 2007). Nous avons établi par la suite que l'activation transitoire de Nox1 joue un rôle majeur dans le contrôle de la polarisation cellulaire. En effet, nous avons démontré, par une approche siRNA et/ou inhibiteur pharmacologique, que l'activation de Nox1, endogène ou stimulée par l'acide arachidonique est nécessaire à la polarisation cellulaire sur Col-I et à l'expression membranaire de l'intégrine α_2 (Sadok A *et al* BBA Mol Cell Res., 2007).

Nos travaux actuels montrent que les ROS de Nox1 contrôlent le « turn-over » des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ par modulation transitoire de l'activité de la GTPase Rho. Nox1 est nécessaire à une inhibition transitoire de Rho permettant une augmentation membranaire de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ au détriment de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. Le knock-out cellulaire de Nox1 aboutit au cours de l'adhérence sur col-I une augmentation transitoire de l'activité Rho/Rock et une augmentation stable de l'expression membranaire de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. Ces effets sont reliés à une augmentation transitoire des forces d'adhérences relayées par Rho/Rock et $\alpha 3\beta 1$ sur le Col-I concomitante à la production de ROS. A plus long terme, ces effets conduisent à une perte de la persistance de migration et peuvent être reversé par un anticorps bloquant l'intégrine $\alpha 3$. Nous montrons ainsi que la NADPH oxydase Nox1 est au cœur de la régulation permettant le maintien d'une migration orientée de cellules épithéliales coliques.

Correspondance : hkovacic@univmed.fr



UMR INSERM 608
Université de la Méditerranée

Physiopathologie de l'Endothélium

L'HOMOCYSTEINE MODULE LE POTENTIEL PROTEOLYTIQUE DE CELLULES MUSCULAIRES LISSES ARTERIELLES HUMAINES

Xue Dan KE, Alexendrine Foucault-Bertaud, Edouard Lamy, Thierry Augier, Cécile Genovesio, Françoise Dignat-George, Philippe Charpiot.

Laboratoire de Biochimie - INSERM U608, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, Marseille, France.

Introduction. L'homocystéine, amino acide physiologique non constitutif des protéines, est reconnu comme facteur de risque pour les pathologies vasculaires occlusives. Des niveaux pathologiques d'homocystéine induisent une dégradation sévère des structures élastiques de la paroi artérielle selon un processus d'élastolyse dépendant de métalloprotéases.

Nous avons précédemment montré que les cellules endothéliales pouvaient participer à la dégradation préférentiellement sous intima des structures élastiques artérielles via les MMP-2 et MMP-9.

Cependant/Par ailleurs, la dégradation des lames élastiques situées dans les premières travées de la media pose la question de/suggère la participation d'un déséquilibre de la balance MMPs/TIMPs des cellules musculaires lisses (CMLs) à cette élastolyse MMP-dépendante.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les effets de l'homocystéine sur le potentiel protéolytique de CML artérielle humaine en culture.

Matériel et Méthodes. Des CMLs isolées à partir d'artères ombilicales humaines ont été mises en culture (milieu DMEM sans sérum, 37°C, 5% CO₂, pendant 24 h) en présence de concentrations d'homocystéine correspondant à des niveaux physiologiques (10 µM) et pathologiques (50, 100, 500 µM) rencontrés en clinique humaine.

La balance MMPs/TIMPs a été étudiée par zymographie et western blot dans les surnageants et les lysats cellulaires, ainsi que par RT-PCR quantitative.

Résultats et Discussion. Des niveaux pathologiques d'homocystéine induisent un déséquilibre de la balance MMPs/TIMPs des CML en faveur des MMPs élastolytiques, et en particulier de la MMP-2. Ces résultats confirment la participation des CMLs à la dégradation MMP-dépendante des structures élastiques induite par l'homocystéine. L'implication du stress oxydant dans ce déséquilibre est en cours d'investigation.

Localisation et rôle des isoformes de CD146 dans les cellules dérivées de progéniteurs endothéliaux circulants

Abdeldjalil Kebir¹, Karim Harhour^{1,2}, Nathalie Bardin¹, Alexandrine Foucault-Bertaud¹, Edouard Lamy¹, Karim Fallague¹, Florence Sabatier^{1,2}, José Sampol¹, Françoise Dignat-George^{1,2} et Marcel Blot-Chabaud¹.

¹UMR-S 608 INSERM-Université de la Méditerranée Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, UFR de Pharmacie, Marseille, France ;

²Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France

CD146 est une immunoglobuline transmembranaire présente essentiellement dans les cellules endothéliales, y compris certains progéniteurs endothéliaux circulants. Elle est impliquée dans différentes fonctions telles que la croissance vasculaire, l'angiogenèse et contrôle la perméabilité et la cohésion de la monocouche endothéliale. De plus, cette molécule a été identifiée comme un marqueur de la progression des mélanomes. Il a été suggéré par PCR qu'en plus de la forme classique de CD146, il existerait une autre isoforme, plus courte. Ces deux isoformes se différencient par la taille de leur domaine intracellulaire.

Le but de notre travail a été : 1) de déterminer la localisation cellulaire des deux isoformes ; 2) de définir leur rôle, dans des cellules dérivées de progéniteurs endothéliaux circulants (EPDC). Dans nos expériences nous avons utilisé des sérums spécifiques de chacune des deux isoformes, des siRNA capables de supprimer spécifiquement l'expression de chacune des deux formes, et des lentivirus contenant soit CD146 deleté de sa partie intracellulaire, soit les formes courte ou longue. Des expériences de microscopie confocale, de prolifération cellulaire (incorporation de BrdU), de formation de tubes en matrigel, de migration cellulaire (expérience de Wound Healing) et de perméabilité transendothéliale (diffusion de dextran à travers des EPDC cultivées sur filtres semi-perméables) ont été effectuées. Les résultats obtenus montrent que l'isoforme courte de CD146 présente une localisation membranaire dans les EPDC en migration et une localisation apicale dans les cellules confluentes. Elle serait impliquée dans les fonctions angiogéniques telles que la prolifération et la migration cellulaire. L'isoforme longue, quant à elle, est localisée dans le compartiment intracellulaire des EPDC en migration et au niveau des jonctions intercellulaires dans les cellules confluentes. Elle remplirait des fonctions structurales comme le contrôle de la perméabilité transendothéliale et l'organisation des jonctions cellulaires au sein des capillaires.

Differences in the phenotypic profile of T cell subsets between Long Term Asymptomatic HIV and HIV treated patients in virological success could contribute to delay the disease progression

C. Brunet¹, P. Colson², N. Bardin¹, I. Ravaux¹, I. Poizot-Martin³, H. Gallais¹, C. Tamalet and F. Dignat-George¹.

¹ Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France

² Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France

³ Centre Hospitalier Universitaire Ste Marguerite, Marseille, France

Background:

A minor proportion of HIV infected patients, termed long term asymptomatic HIV infected patients (LTA) remain healthy and immunologically stable in spite of HIV infection for more than 7 years and the absence of antiretroviral therapy. An extensive immunophenotypic pattern of markers of differentiation, functionality and activation on peripheral blood T cells has never been investigated for LTA patients. In this study, 11 LTA patients with plasma HIV-1 RNA (VL) <1,000 copies/ml were analyzed in comparison with HIV treated patients in virological success and a control group of healthy subjects using a large panel of lymphocytes markers.

Methods:

Cross-sectional analysis was performed for 11 LTA HIV-1 infected patients followed-up in Marseilles. Their VL was <1,000 copies/ml using Cobas Roche Amplicor test and an in house assay. To analyze more accurately the immune reconstitution, differentiated (CD4+/CD45RA+), functional (CD4+/CD28+) and activated (CD8+/CD38+) subsets of T lymphocytes were quantified using 3-color-flow cytometric analysis of blood samples. Results were compared to those obtained from 20 HIV-seronegative individuals and to 135 HIV-1 treated patients with HIV RNA < 2.7log₁₀ copies/ml since > 2years. Statistical analysis was performed using Kruskal Wallis test.

Results:

6/11 LTA were men; median age, 38 years. A significant difference was observed for CD4+ and CD8+T cell counts (expressed in median values) between HIV treated patients (respectively 517 and 984 cells/μl) and controls (1029 and 546). In contrast, no difference was observed between LTA (718 and 670) and HIV treated patients nor controls. Naïve CD4+ T cell counts (CD4+CD45RA+) were significantly lower in HIV treated patients (p<0.001), and in a lesser way (p<0.05) in LTA, than in control subjects. CD4+CD45RA+ cell counts were higher in LTA than in HIV treated patients, however, not significantly. CD4+CD28+ T cell count was significantly higher in LTA than in HIV treated patients (p<0.05) whereas CD8+CD38+ cell count was significantly lower in LTA patients (p<0.05). No statistical difference was observed between LTA and controls for these markers. Interestingly in our HIV-1 positive cohort, we dispose of two radically different immunophenotypical patterns and control of HIV replication in two spouses infected by same HIV-1 strains.

Conclusion:

Altogether our data showed that analysis of functional (CD4+CD28+) and activated (CD8+CD38+) T cell markers may offer the opportunity to understand the development of the protective immune responses generated in LTA patients. Together with CD4+Tcell counts, they could also be used to monitor infection and predict the disease progression.

Transplanted late outgrowth endothelial cells from human cord blood improve neurological outcome through angiogenesis and apoptosis inhibition after stroke

C. Moubarik⁽¹⁾, J.L. Codaccioni⁽²⁾, L. Velly⁽²⁾, F. Sabatier⁽¹⁾, F. Dignat-George⁽¹⁾, B. Guillet⁽¹⁾, P. Pisano⁽¹⁾

(1) UMR INSERM 608, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France

(2) Département d'Anesthésie-Réanimation CHU Timone, 254 rue Saint-Pierre, 13005 Marseille, France

Introduction:

Endothelial progenitor cells (EPCs) are a novel promising option for treatment of patients with ischemic diseases due to their capacity to promote angiogenesis. In this work, we characterized the effect of late outgrowth EPCs (OECs) transplantation in a model of transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rat.

Methods:

OECs were obtained from human umbilical cord blood after 15 days of culture. Adult male Sprague-Dawley rats were subjected to 1 hour of MCAO using the intraluminal filament technique. Experimental groups were as follows: transplanted (intravenous injection of $4-5 \times 10^6$ OECs 24 hours after MCAO, n=12) and control (intravenous injection of PBS at 1 day after MCAO, n=13). Body weight, adhesive-removal dot test and the modified neurological severity score test were performed over the 14 days following MCAO. Animals were euthanized at 7 or 14 days after MCAO and coronal brain sections were prepared to measure brain infarct volumes and to perform immunochemical staining of the human transplanted cells (mab1281, human CD31), apoptosis detection (TUNEL) and capillary density (Alkaline phosphatase [ALP]) staining.

Results:

Animal body weights were significantly higher in transplanted group 7 days after MCAO compared to control group ($P < 0.05$). Significantly higher neurological performance were found in transplanted rats, 7, 10 and 14 days after MCAO compared to control rats ($P < 0.05$). Immunochemical staining showed that OECs migrate, survived and preferentially localized in the ischemic boundary zone. No difference has been observed in term of infarct volume between groups (control vs transplanted: D7: $95.2 \pm 62.2 \text{ mm}^3$ vs $103.8 \pm 48.7 \text{ mm}^3$; $P = 0.851$ and D14: $188.0 \pm 30.3 \text{ mm}^3$ vs $189.4 \pm 111.3 \text{ mm}^3$; $P = 0.98$). At day 3, apoptotic cell number was significantly lower in the ischemic boundary zone in transplanted rats ($48.0 \pm 18/\text{mm}^2$) compared to control rats ($130.0 \pm 50/\text{mm}^2$) ($P < 0.05$). ALP staining showed an increase in the ratio of capillary density between ischemic and non ischemic hemisphere at the boundary of the ischemic lesion in transplanted rats (n=4; 2.80 ± 0.3) compared to control rats (n=4; 1.72 ± 0.7) 14 days after MCAO ($P = < 0.05$).

Conclusion:

OECs administered intravenously 24h after MCAO enter brain, survive, migrate, and improve functional recovery. Neurological benefits resulting from OECs treatment may involved reduction of ischemia-induced and a stimulation of ischemia-induced angiogenic response. These data suggest potential therapeutic effects of OECs in cerebrovascular ischemic diseases.

Progéniteurs Endothéliaux Circulants, Toxines Urémiques et Rigidité Artérielle chez les Patients en Hémodialyse Chronique

N. Jourde-Chiche^{1,2}, L. Dou¹, F. Sabatier^{1,3}, A. Basire³, L. Arnaud³, M.A. Salaris³, S. Robert¹, R. Calaf⁴, C. Cerini¹, Y. Berland², F. Dignat-George^{1,3}, P. Brunet^{1,2}

¹UMR-S 608 INSERM-Université de la Méditerranée Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, UFR de Pharmacie, Marseille, France ;

²Service de Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France ;

³Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France ;

⁴Université de la Méditerranée Laboratoire de Biochimie, UFR de Pharmacie, Marseille, France ;

Résumé :

L'insuffisance rénale chronique (IRC) entraîne une athérosclérose accélérée. Un dysfonctionnement endothélial, première étape de l'athérosclérose, est présent chez les patients IRC. Plusieurs toxines urémiques ont montré un effet délétère sur les cellules endothéliales in vitro. Il est nécessaire de rechercher des marqueurs de dysfonctionnement endothélial in vivo pour démontrer l'effet des toxines urémiques. L'un de ces marqueurs est le nombre de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), dont la diminution pourrait causer un défaut de réparation endothéliale. Ce travail a pour objectif principal de compter les PEC chez les patients hémodialysés chroniques (HDC) non diabétiques, et de rechercher des corrélations entre le nombre de PEC, les taux de certaines toxines et les marqueurs de lésions vasculaires. Trente-huit patients HDC sont étudiés. Différents types de progéniteurs sont comptés : les cellules CD34+, CD133+/CD34+ et KDR/CD34+, analysées par cytométrie en flux ; les colony forming unit – endothelial cells, mesurées par test clonogénique ; et enfin les cellules angiogéniques circulantes, identifiées par culture cellulaire. Les toxines dosées sont l'homocystéine, la β 2 microglobuline (β 2m), le p-crésol sulfate, l'indoxyl sulfate et l'indole-3 acétique acide (IAA). Les marqueurs vasculaires étudiés sont la pression pulsée, la vitesse de l'onde de pouls aortique (VOP), et l'index de pression systolique cheville/bras (IPS).

Les résultats montrent :

Une corrélation positive entre le nombre de PEC et la rigidité artérielle évaluée par la VOP, qui pourrait correspondre à une réponse adaptée à la présence de lésions vasculaires

Une corrélation négative entre le nombre de PEC et les taux de β 2m et d'IAA, ce qui suggère un effet négatif de ces toxines sur la réparation endothéliale des patients HDC.

Cette étude établit pour la première fois une relation entre le nombre de PEC et la rigidité artérielle des patients HDC. Elle suggère également que certaines toxines urémiques pourraient avoir une influence sur la mobilisation ou la différenciation des PEC.

Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation

Ghassan Al-Massarani,^{1,2} Henri Vacher-Coponat,³ Pascale Paul,^{1,2} Andersen Loundou,⁴ Agnès Widemann¹, Stéphane Robert¹, Y Berland³, Françoise Dignat-George,^{1,2} Laurence Camoin-Jau^{1,2}

¹UMR-S 608 INSERM-Université de la Méditerranée Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, UFR de Pharmacie, Marseille, France ;

²Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France ,

³Service de Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, France

⁴Délégation à la Recherche Clinique, Faculté de Médecine, Marseille, France

Endothelial dysfunction has been reported in haemodialysis and kidney transplanted patients and can be enhanced by immunosuppressive therapy. Circulating endothelial cells (CEC), endothelial microparticles (EMP) and sVCAM-1 have provided information on endothelium activation and/ or damage.

The objective was to compare the impact of two immunosuppressive regimen (CsA/Aza vs Tac/MMF) on the kinetics of CEC, EMP and sVCAM-1 levels in 52 haemodialysis patients during the first year post-graft by reference to 50 healthy controls donors.

One-year post transplant (M12), CEC, EMP and sVCAM-1 levels were significantly lower than before graft regardless of the treatment. While EMP counts reached normal values, CEC and sVCAM-1 levels were still significantly higher than in controls at M12. When compared to the Tac/MMF treated group, earlier improvement of EMP and lower CEC counts were observed in patients treated by CsA/Aza. We further investigated possible relationships between endothelial markers and clinical history such as cardiovascular diseases (HCVD) and cytomegalovirus infection. At M12, the CEC and EMP levels decreased significantly only in patients without HCVD. Also, higher levels of EMP were observed in patients with CMV infection.

In conclusion, as evaluated through non invasive circulating endothelial markers, renal transplantation decrease endothelial alteration with a more pronounced effect in patients treated by CsA/Aza. This may reflect the reduced cardiovascular risk after kidney transplant but also provide early markers reflecting persistence of vascular injury in transplanted patients.

Mouse MCAM/CD146 is a marker of natural killer cell maturation

Nicolas DESPOIX ¹, Thierry WALZER ², Eric VIVIER ², Françoise DIGNAT-GEORGE ¹ and Frédéric VELY ¹

¹ UMR-S608, INSERM-Université de la Méditerranée, Marseille, France

² U631-UMR6102, INSERM-CNRS-Université de la Méditerranée, CIML, Marseille, France.

Cell surface expression of adhesion molecules plays a crucial role in extravasation and tissue infiltration of leucocytes. Among them, CD146/Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM) is expressed by endothelium and by a very small fraction of activated T and B lymphocytes in humans. Using a set of novel rat anti-mouse CD146 monoclonal antibodies, we have analyzed the pattern of CD146 expression in mouse leukocytes. We demonstrate that in contrast with reported leukocyte staining in humans, only NK cells and neutrophils express CD146 in mice. Interestingly, classical T lymphocytes as well as CD3+ NK1.1+ T lymphocytes do not express CD146. Higher level of CD146 expression is found in the mature CD27-CD11b+ NK cell subpopulation indicating that CD11b/CD146 costaining of lymphocytes can be efficiently used to detect mature NK cell population. Cross-linking of CD146 in NK cells do not induce their activation, suggesting that CD146 is not a primary activating receptor on murine NK cells. These findings define CD146 as a marker of mouse NK cell maturation and raise the possibility that CD146 may be involved in mouse NK cell trafficking.



FACULTÉ DE PHARMACIE
DE MARSEILLE



UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE
AIX-MARSEILLE II



UNIVERSITÉ
DE LA
MÉDITERRANÉE
AIX-MARSEILLE II

