

## Liste des sujets mis au concours

### **Caractérisation des intégrons et du résistome de sédiments anthropisés estuariens**

**Contact** : Thierry Berthe, UMR M2C 6143, Université de Rouen  
Tel : 02 35 14 67 81; e-mail : [thierry.berthe@univ-rouen.fr](mailto:thierry.berthe@univ-rouen.fr)

### **Signature biogéophysique associée à la biodégradation de sites contaminés par des hydrocarbures**

**Contact** : Jean Paul Dupont UMR CNRS M2C, Université de Rouen  
Tel : 02 35 14 66 22 ; e-mail : [jean-paul.dupont@univ-rouen.fr](mailto:jean-paul.dupont@univ-rouen.fr)

### **Réponse immunitaire de bivalves aux motifs moléculaires associés aux pathogènes et aux bactéries – effets de la température et des contaminants aquatiques**

**Contact** : Frank Le Foll, Laboratoire d'Ecotoxicologie – Milieux Aquatiques EA 3222, Université du Havre, Tel : 02 32 74 43 04 ; e-mail : [frank.lefoll@univ-lehavre.fr](mailto:frank.lefoll@univ-lehavre.fr)

### **Impact de la dynamique particulière dans la zone turbide estuarienne sur le flux et la diversité des communautés microbiennes dans la colonne d'eau**

**Contact** : Fabienne Petit, UMR M2C, Université de Rouen  
Tel : 02 35 14 66 84; e-mail : [fabienne.petit@univ-rouen.fr](mailto:fabienne.petit@univ-rouen.fr)

### **Rôle du récepteur Ror1 et de la voie Wnt non-canonique dans la physiopathologie des neuroblastomes**

**Contact** : Youssef Anouar, U INSERM 982, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 66 61 ; [youssef.anouar@univ-rouen.fr](mailto:youssef.anouar@univ-rouen.fr)

### **Myopathies nécrosantes : rôle pathogène des auto-anticorps et identification de nouveaux auto-antigènes.**

**Contact** : Olivier Boyer, U INSERM 905, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 85 35 ; e-mail : [olivier.boyer@chu-rouen.fr](mailto:olivier.boyer@chu-rouen.fr)

### **Caractérisation des mécanismes cellulaires sous-jacents à la propagation des protéines pathologiques Tau et TDP-43 de cellule à cellule dans les démences, en utilisant la drosophile comme modèle expérimental.**

**Contact** : Magalie Lecourtois, U INSERM 1079, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 82 80; e-mail : [magalie.lecourtois@univ-rouen.fr](mailto:magalie.lecourtois@univ-rouen.fr)

### **Organisation fonctionnelle de l'appareil de Golgi chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornutum*, deux microalgues émergentes pour la production de glycoprotéines recombinantes à intérêt thérapeutique.**

**Contact** : Muriel Bardor, laboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 67 58; e-mail : [muriel.bardor@univ-rouen.fr](mailto:muriel.bardor@univ-rouen.fr)

### **Evaluation des stratégies pharmacologiques ciblant la voie des acides époxyeicosatriénoïques pour le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales**

**Contact** : Jérémy Bellien, U INSERM 1096, Université de Rouen  
Tél : 02 32 88 14 28 ; e-mail : [jeremy.bellien@chu-rouen.fr](mailto:jeremy.bellien@chu-rouen.fr)

### **Effet des changements de pratiques agronomiques sur la biodiversité fonctionnelle des sols- conséquences sur les stocks de C et la disponibilité de l'azote. (AGROBIOF).**

**Contact** : Michael Aubert, laboratoire ECODIV, Université de Rouen  
Tel : 02 32 76 94 47; e-mail : [michael.aubert@univ-rouen.fr](mailto:michael.aubert@univ-rouen.fr)

**Déterminisme biotique de l'émergence de la pourriture racinaire du pois et impact de biopesticides**

**Contact** : Karine Laval, laboratoire AGTI-TERR, ESITPA

Tél : 02 32 82 91 44; e-mail : [klaval@esitpa.org](mailto:klaval@esitpa.org)

**Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole: cas du pathosystème *Choisya ternata* / *phytophthora* spp**

**Contact** : Maïté Vicré-Gibouin, laboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen

Tél : 02 35 14 67 68; e-mail : [Maite.Vicre@univ-rouen.fr](mailto:Maite.Vicre@univ-rouen.fr)

**Expression et rôles du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX dans l'adaptation à son environnement, la formation de biofilm et la réponse aux antimicrobiens du pathogène opportuniste de l'homme *Pseudomonas aeruginosa***

**Contact** : Sylvie Chevalier, LMSM EA4312, Université de Rouen

Tél : 02 32 29 15 60; e-mail : [sylvie.chevalier@univ-rouen.fr](mailto:sylvie.chevalier@univ-rouen.fr)

**Caractérisation des intégrons et du résistome de sédiments anthropisés estuariens**

**Contact** : Thierry Berthe, UMR M2C 6143, Université de Rouen  
Tel : 02 35 14 67 81; e-mail : thierry.berthe@univ-rouen.fr

Les eaux estuariennes sont le milieu récepteur final de la contamination par les bactéries fécales antibiorésistantes qui décantent sur les vasières, zones de dépôt des particules fines et des contaminants chimiques. Le résistome microbien ainsi enrichi constituerait un réservoir susceptible d'être transféré à des bactéries potentiellement pathogènes. Le projet de thèse se propose d'évaluer l'évolution sur 50 ans du résistome (résistances aux antibiotiques et aux contaminants chimiques), des sédiments d'une carotte prélevée en estuaire de Seine, à proximité des rejets d'une station d'épuration. Les intégrons de résistance (IR), supports génétiques de résistance répandus dans le monde bactérien, et pouvant héberger plusieurs gènes. Ils constituent un marqueur global facilement détectable d'acquisition de la résistance. La quantification et la caractérisation des gènes de résistances et des IR au sein de cette carotte sédimentaire, permettra d'étudier la diversité et le rôle des résistomes environnementaux comme « hot spot » favorables à l'émergence de bactéries résistantes ou co-résistantes aux antibiotiques et aux contaminants chimiques. A ce jour, plus de 130 cassettes de résistance aux antibiotiques ont été décrites codant des résistances à quasiment toutes les familles d'antibiotiques actives sur les bactéries à Gram négatif. A côté des intégrons de résistance aux antibiotiques, de nombreux intégrons ont été décrits chez des bactéries environnementales avec de nombreuses cassettes de gènes (> 100) codant des fonctions variées. Dans le milieu estuarien anthropisé, où la contamination chimique exerce une pression de sélection sur les microorganismes, les intégrons seront un facteur essentiel dans l'adaptabilité génétique des communautés microbiennes. De part la multitude de cassettes pouvant être hébergées, les intégrons constituent un marqueur global d'acquisition de multirésistance aux antibiotiques et /ou aux contaminants chimiques.

L'objectif de la thèse sera de caractériser les intégrons et le résistome de sédiments anthropisés estuariens. Ce projet est réalisable grâce à (i) l'accès à une carotte de 5 m prélevée dans le cadre du programme « Seine-Aval », datée par dosage au  $^{137}\text{Cs}$  (<1960-2008) (ii) un consortium interdisciplinaire incluant des hydrosédimentologues, des microbiologistes cliniques et de l'environnement dont une équipe étrangère. Le doctorant sera accueilli au laboratoire de Morten Sommers au Danemark.

**Signature biogéophysique associée à la biodégradation de sites contaminés par des hydrocarbures**

**Contact** : Jean Paul Dupont UMR CNRS M2C, Université de Rouen  
Tel : 02 35 14 66 22 ; e-mail : jean-paul.dupont@univ-rouen.fr

Les activités industrielles sont à l'origine du développement de sites contaminés dont certains deviennent des friches industrielles. Dans ce type de contexte, la détection et le suivi du devenir des contaminants sont le plus souvent réalisés à partir d'analyses des échantillons de sols et d'eaux prélevées dans quelques piézomètres de surveillance disposés sur le pourtour des parcelles concernées. La caractérisation de ces processus par l'intermédiaire de quelques forages n'offre qu'une vision partielle du système hydrogéochimique. Dans le cas de sols contaminés par des produits pétroliers, nous nous proposons d'expérimenter l'utilisation d'approches géophysiques (en particulier les méthodes géoélectriques : la résistivité électrique, la polarisation spontanée et polarisation induite spectrale) pour (i) identifier la distribution spatiale des contaminants dans les eaux des formations superficielles ii) suivre l'évolution des processus biophysicochimiques de la bioremédiation des aquifères. L'étude portera sur: (i), des essais en microcosmes de laboratoire en appliquant une stimulation bactérienne pour comprendre les phénomènes biophysicochimiques à l'origine des réponses géophysiques et (ii) et l'application des approches géophysiques sur des sites contaminés. Dans les deux cas, les données géoélectriques seront étalonnées par rapport à l'analyse des hydrocarbures et de leurs métabolites.

**Réponse immunitaire de bivalves aux motifs moléculaires associés aux pathogènes et aux bactéries – effets de la température et des contaminants aquatiques**

**Contact** : Frank Le Foll, Laboratoire d'Ecotoxicologie – Milieux Aquatiques EA 3222,  
Université du Havre  
Tel : 02 32 74 43 04 ; e-mail : frank.lefoll@univ-lehavre.fr

L'immunité des organismes aquatiques, à l'interface des interactions hôte-pathogènes-environnement, est affectée par les changements globaux liés à l'activité anthropique. Les mollusques bivalves, comme les autres invertébrés, ont une immunité exclusivement innée qui repose sur l'activité des hémocytes (notamment la phagocytose et la sécrétion de peptides antimicrobiens). Ces cellules en suspension dans l'hémolymphe migrent vers les tissus infectés. Au Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques de l'Université du Havre nous avons mis au point une technique de vidéomicroscopie permettant de quantifier la motilité hémocytaire. Nous utilisons également la cytométrie en flux pour différencier les sous-populations hémocytaires. Le sujet de thèse proposé vise à caractériser les effets d'expositions à des PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) ou des contaminants bactériens conjointement à des contaminants chimiques, sur la migration cellulaire (chimiokinèse, chimiotactisme, necrotactisme) et d'autres fonctions hémocytaires (bouffée oxydative, phagocytose, phénotype *MultiXenobiotic Resistance*) chez *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha*. Les expériences consisteront en des expositions d'hémocytes en culture et d'animaux en aquarium. Les résultats attendus devraient permettre une meilleure compréhension de l'immunité innée des bivalves ainsi que des outils permettant d'estimer les effets délétères des changements environnementaux sur le système immunitaire de ces organismes.

**Impact de la dynamique particulaire dans la zone turbide estuarienne sur le flux et la diversité des communautés microbiennes dans la colonne d'eau**

**Contact** : Fabienne Petit, UMR M2C, Université de Rouen  
Tel : 02 35 14 66 84; e-mail : fabienne.petit@univ-rouen.fr

Dans la colonne d'eau, la dynamique des matières en suspension, principalement contrôlée par la dynamique des marées et le gradient de salinité, est d'autant plus complexe qu'il s'y ajoute les processus de floculation. Les bactéries sont des composants biologiques majeurs dans la constitution des floes, essentiellement en raison de leurs propriétés d'adhésion et/ou la sécrétion d'exopolymères cohésifs. A l'échelle de ce microenvironnement, le maintien de l'activité et de la viabilité des communautés microbiennes dépendra de leur aptitude à surmonter les stress mécanique et osmotique permanents, dont l'intensité sera fonction de l'hydrodynamique du système, et le stress chimique. L'objectif du travail de thèse, est de caractériser la structure des composants particulières des floes présents dans la zone de l'embouchure d'un estuaire macrotidal fortement anthropisé (Seine). Cette étude multi échelle (floc - bactérie- nanoparticule) s'appuie sur une démarche inter -disciplinaire (sédimentologie, écologie microbienne, physico-chimistes des nanoparticules) et se focalise sur les questions suivantes : quelle est la contribution, et la diversité des microorganismes dans la constitution des floes ? Les communautés microbiennes sont elles seulement un facteur cohésif, ou sont elles actives? Le forçage hydrodynamique permanent, cycle de suspension- floculation-défloculation, exerce-t il une pression de sélection sur les communautés microbiennes issues de l'érosion des sédiments de surface.

## Rôle du récepteur Ror1 et de la voie Wnt non-canonique dans la physiopathologie des neuroblastomes

**Contact** : Youssef Anouar, U INSERM 982, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 66 61 ; [youssef.anouar@univ-rouen.fr](mailto:youssef.anouar@univ-rouen.fr)

Les neuroblastomes sont des tumeurs pédiatriques qui se développent à partir du système nerveux sympathique et qui sont responsables de 15% des décès d'enfants dus au cancer. La voie de signalisation Wnt, qui est un acteur majeur du développement embryonnaire, joue un rôle crucial dans la formation et la progression de différents types de cancer. Nous avons récemment mis en évidence un taux d'expression élevé des récepteurs Wnt non-canoniques Ror1 et Ror2 dans plusieurs lignées cellulaires dérivées de neuroblastome, ce qui est souvent associé à une phosphorylation constitutive liée à une activation autocrine de cette voie de signalisation. A l'aide de vecteurs lentiviraux pour ARN interférence, nous avons montré que la réduction de l'expression de Ror1 entraîne une baisse de la croissance des cellules de neuroblastome. Pour ce projet, nous avons mis au point un système inductible d'ARN interférence qui nous permettra d'étudier plus en détail les effets de l'inhibition de Ror1 sur la survie et/ou la prolifération des neuroblastomes *in vitro* et *in vivo*, et de tester les effets synergiques potentiels d'un co-traitement par les ARN interférents de Ror1 et des agents chimiothérapeutiques communément utilisés pour ce type de tumeur, tels que le carboplatine et la doxorubicine. En parallèle, nous utiliserons des lignées cellulaires, ainsi que des échantillons tumoraux correspondant à des stades cliniques différents, afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la surexpression de Ror1/2 dans les neuroblastomes et identifier un lien potentiel avec certains événements tumorigéniques typiques de ces tumeurs. Enfin, nous étudierons les mécanismes associés à l'activation de Ror1, et notamment l'implication des ligands Wnt et les voies de transduction régulées par ces récepteurs. L'ensemble de ces expériences nous permettra de mieux comprendre les effets de Ror1 dans les neuroblastomes et de tester le rôle de ce récepteur en tant que nouvelle cible potentielle pour le traitement de ces tumeurs.

**Myopathies nécrosantes : rôle pathogène des auto-anticorps et identification de nouveaux auto-antigènes.**

**Contact** : Olivier Boyer, U INSERM 905, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 85 35 ; e-mail : olivier.boyer @ chu-rouen.fr

Les myopathies nécrosantes auto-immunes (MNAI) constituent un groupe récemment individualisé de myopathies acquises graves. Elles peuvent être associées à la production d'auto-anticorps (auto-Acs) dirigés contre la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMGCR) et sont parfois secondaires à un traitement par les statines, inhibiteurs de la HMGCR très utilisés chez l'Homme. Les objectifs de la thèse sont de:

1/ établir si les auto-Acs anti-HMGCR exercent un rôle pathogène direct et en déterminer le mécanisme;

2/ établir un modèle murin de MNAI et étudier le rôle protecteur éventuel du neuropeptide PACAP;

3/ identifier de nouveaux auto-Acs dans les MNAI.

Des souris, traitées ou non par statines, seront immunisées par la HMGCR recombinante ou subiront un transfert passif d'auto-Acs anti-HMGCR de patients (IgG totales ou anticorps anti-HMGCR purifiés). Le poids, la force musculaire et une série de paramètres immunologiques seront suivis. L'IRM recherchera des lésions musculaires et en déterminera la topographie. Les muscles atteints seront analysés histologiquement (H&E, immuno-marquage), l'expression de HMGCR y sera mesurée et les transcriptome et protéome étudiés. L'effet protecteur du PACAP ou d'analogues *in vivo* sera recherché.

De nouveaux auto-Acs seront criblés chez les patients atteints de MNAI sans auto-Acs connus (50% des cas) par électrophorèse 2-D et spectrométrie de masse, ou analyse protéomique à haut débit (Orbitrap) après immuno-précipitation avec des sérums de patients. Les auto-antigènes seront clonés, produits et des dosages spécifiques (Luminex) seront mis au point.

Cette thèse devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie des MNAI, d'en offrir le premier modèle murin, d'en améliorer le diagnostic et d'évaluer de nouveaux traitements candidats. La découverte de nouveaux auto-Acs dans le sérum de patients considérés actuellement comme séro-négatifs permettra une meilleure classification nosologique des MNAI et guidera le traitement.



**Caractérisation des mécanismes cellulaires sous-jacents à la propagation des protéines pathologiques Tau et TDP-43 de cellule à cellule dans les démences, en utilisant la drosophile comme modèle expérimental.**

**Contact :** Magalie Lecourtois, U INSERM 1079, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 82 80; e-mail : magalie.lecourtois@univ-rouen.fr

L'accumulation de protéines spécifiques sous forme d'inclusions est une caractéristique de nombreuses maladies neurodégénératives, parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer (MA) avec le peptide amyloïde (Ab), la protéine Tau et la protéine TDP-43, la maladie de Parkinson (MP) avec l'a-synucléine, les démences lobaires frontotemporales avec les protéines Tau, TDP-43 et FUS, et la maladie de Creutzfeldt-Jakob avec la protéine Prion. La répartition anatomique des dépôts pathologiques/lésions dans la MA et la MP est évocatrice d'une propagation progressive des agrégats de protéines au cours de la progression de la maladie. Plusieurs études récentes, menées dans des systèmes cellulaires ou dans des modèles murins, montrent que des formes agrégées des protéines Tau, Ab et a-synucléine peuvent se propager de cellule-à-cellule et d'une région du cerveau à une autre, phénomènes considérés jusqu'ici comme spécifiques des maladies à Prions. La propagation de protéines agrégées de cellule-à-cellule pourrait donc être un principe général sous-jacent à la détérioration progressive dans les maladies neurodégénératives. Les neurones utilisent une variété de stratégies et de structures intercellulaires pour communiquer entre eux. Récemment, plusieurs types de «connexions longue distance», dont les nanotubes membranaires (Tunneling nanoTubes; TnTs) ont été décrits. Ils permettent notamment le transfert in vitro de la protéine Prion entre les cellules. Les exosomes, qui sont de petites vésicules membranaires sécrétées in vitro, pourraient également transférer divers types d'informations ou signaux entre les cellules. Les protéines Prion, a-synucléine, Tau, Ab et TDP-43 pourraient être sécrétées via cette voie de sécrétion non conventionnelle. Enfin, le couplage plus classique de la sécrétion régulée/constitutive et de l'endocytose peut également participer au transfert de protéines de cellule à cellule. L'objectif principal de notre projet sera donc d'identifier in vitro les mécanismes de transfert intercellulaire des protéines Tau et TDP-43, sans exclure de modalité a priori (TnTs, exosomes, vésicules de sécrétion ...). Nous avons récemment développé et caractérisé de nouveaux modèles transgéniques drosophile capables de surexprimer, grâce au système d'expression Gal4/UAS, les protéines Tau ou TDP-43 humaines. Ces modèles récapitulent plusieurs caractéristiques des pathologies humaines, parmi lesquelles des propriétés biochimiques spécifiques des pathologies, une neurodégénérescence progressive et une mort précoce. La méthodologie de notre projet de recherche est donc essentiellement basée sur l'étude de co-cultures primaires de neurones, issus de modèles drosophile transgéniques génétiquement différents (capables de surexprimer, ou non, nos protéines d'intérêt), par des approches d'imagerie cellulaire à haute résolution.

La première étape de ce projet consistera, à vérifier pour la protéine Tau et à mettre en évidence pour la protéine TDP-43, leur propagation/leur transfert de cellule-à-cellule dans des co-cultures primaires de neurones. Concrètement, des cultures primaires de neurones seront développées à partir de cerveaux entiers de mouches «capables» d'exprimer nos protéines d'intérêt (Tau ou TDP-43) et de mouches «capables» d'exprimer la protéine fluorescente GFP (green fluorescent protein). Après mise en présence de ces cultures et induction de l'expression de nos protéines d'intérêt, leur localisation subcellulaire, et notamment leur présence dans les cellules GFP+, sera étudiée grâce à des expériences d'immunofluorescence suivie d'analyses par microscopie confocale. Dans une seconde étape, nous déterminerons les modalités de transfert des protéines Tau et TDP-43 de cellule-à-cellule en utilisant plusieurs approches complémentaires. A ce jour, l'existence de cytonèmes/TnTs dans des cultures primaires de neurones de drosophile restant non démontrée, leur identification et caractérisation seront tout d'abord réalisées par vidéomicroscopie (lumière transmise), par microscopie confocale et STED (STimulated Emission Depletion). La présence des protéines Tau et TDP-43 dans les TnTs sera ensuite étudiée sur cellules fixées par des expériences de double marquage protéine d'intérêt/marqueur des TnTs. Les dynamiques de transfert de cellule-à-cellule seront quant à elles analysées sur cellules vivantes grâce à l'utilisation de protéines d'intérêt fusionnées aux protéines fluorescentes (YFP/RFP). La présence des protéines Tau et TDP-43 dans les exosomes sera étudiée en suivant deux stratégies. Après purification à partir des milieux de culture grâce à des étapes d'ultracentrifugation, la présence de nos protéines d'intérêt dans ces

microparticules sera analysée par western blot et par cytométrie en flux. D'autre part, les mécanismes de transfert par les exosomes contenant nos protéines d'intérêt sur des neurones naïfs vivants seront suivis par microscopie confocale et STED. La présence de nos protéines d'intérêt dans les vésicules de sécrétion et les mécanismes de libération seront étudiés par microscopie à ondes évanescentes (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, TIRF) en utilisant les constructions protéines d'intérêt/protéines fluorescentes (GFP/RFP) et des marqueurs fluorescent de vésicules. Cette stratégie nous permettra de visualiser les évènements de libération sous forme de flashes de fluorescence, selon les voies constitutive ou régulée. Les approches de vidéomicroscopie, microscopie confocale, de STED et de microscopie TIRF sont disponibles et fonctionnels sur PRIMACEN.

**Organisation fonctionnelle de l'appareil de Golgi chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornerum*, deux microalgues émergentes pour la production de glycoprotéines recombinantes à intérêt thérapeutique.**

**Contact :** Muriel Bardor, laboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 67 58; e-mail : [muriel.bardor@univ-rouen.fr](mailto:muriel.bardor@univ-rouen.fr)

Les microalgues, organismes eucaryotes et photosynthétiques, sont des systèmes émergents de production de protéines recombinantes. Cependant, démontrer le potentiel des microalgues comme système alternatif de production de protéines thérapeutiques requiert une compréhension approfondie de leur mécanisme de glycosylation puisque 95% des protéines à intérêt thérapeutique sont des glycoprotéines. *Chlamydomonas reinhardtii* et *Phaeodactylum tricornerum* sont deux microalgues actuellement utilisées pour la production de protéines recombinantes. Nous avons déjà montré qu'elles sont capables de glycosyler leurs protéines endogènes avec des structures espèces spécifiques. La caractérisation fine de leurs processus de glycosylation requiert maintenant une étude fonctionnelle de l'appareil de Golgi, lieu où ces mécanismes se mettent en place. Ainsi, nous proposons dans ce projet de localiser et cartographier par microscopies multi-échelles les glycoenzymes impliquées dans la maturation des N-glycannes. Cette étude sera réalisée *via* l'expression chez les microalgues des glycoenzymes fusionnées à une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein ou variants). Les transformants obtenus seront d'abord analysés par microscopies macro- et microconfocales afin d'évaluer la localisation et la dynamique des glycoenzymes. Ensuite, leur localisation sub-cellulaire dans l'appareil de Golgi sera examinée par immunocytochimie indirecte couplée à la microscopie électronique à transmission. Pour cela, les protocoles de congélation à haute-pression, de cryosubstitution et d'immuno-marquage développés au laboratoire pour les plantes supérieures seront mis à profit et optimisés pour les microalgues. Ces résultats permettront *in fine* d'optimiser la glycosylation des protéines recombinantes produites dans ces modèles en vue d'une utilisation thérapeutique chez l'homme.

## **Evaluation des stratégies pharmacologiques ciblant la voie des acides époxyeicosatriénoïques pour le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales**

**Contact** : Jérémy Bellien, U INSERM 1096, Université de Rouen

Tél : 02 32 88 14 28 ; e-mail : jeremy.bellien@chu-rouen.fr

L'endothélium vasculaire participe de façon centrale à la régulation du tonus artériel, de la fonction plaquettaire, de la coagulation et de l'inflammation. Il est maintenant bien établi que la plupart des facteurs de risque cardiovasculaires affectent de façon marquée ces phénomènes de régulation endothéliale, en particulier via une réduction de la production de monoxyde d'azote (NO) par ces cellules, et que ces altérations jouent un rôle déclenchant et/ou aggravant majeur des maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'endothélium constitue une cible centrale des traitements de ces maladies. En parallèle du NO, les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) sont également des facteurs endothéliaux vasodilatateurs et anti-inflammatoires, produits à partir de l'acide arachidonique par des cytochromes P450 époxygénases. Chez l'homme, nous avons démontré que les EETs contribuent de façon majeure à la régulation de la vasomotricité artérielle (Bellien et al, Hypertension 2006, 2010). Dans le cadre d'un projet de recherche translationnelle (Inserm/DHOS 2009), nous avons montré que l'augmentation de la biodisponibilité des EETs au moyen d'inhibiteurs de leur dégradation par l'époxyde hydrolase soluble (sEH), constitue une nouvelle approche pour la prise en charge de l'hypertension artérielle (Gao et al, J Hypertens 2011, Bellien et al, Circulation 2012, Hypertension 2012).

Le présent projet vise à développer au plan fondamental cette thématique menée par J. Bellien, nouvellement titulaire d'une HDR. L'objectif global du présent projet est d'évaluer l'impact des inhibiteurs de la sEH ou des analogues d'EETs 1) sur les anomalies métaboliques et l'atteinte d'organes cible associées au diabète de type 2 et 2) sur les conséquences fonctionnelles des maladies rénales.

Malgré le contrôle de l'hyperglycémie et des principaux facteurs de risque, le diabète de type 2 reste associé à une forte morbidité cardiovasculaire. La découverte de nouvelles cibles pharmacologiques limitant l'atteinte des organes cibles est donc un objectif essentiel pour la prise en charge des patients. Ainsi, dans la première partie de ce projet, nous évaluerons l'impact du t-AUCB, un inhibiteur de la sEH de dernière génération administrable par voie orale, sur la dysfonction endothéliale coronaire, la dysfonction cardiaque diastolique et l'atteinte rénale dans un modèle murin d'insulino-résistance induite par la prise d'un régime alimentaire riche en graisses pendant 4 mois. Ensuite, nous chercherons à discriminer les effets des différents isoformes d'EETs (4,5-EET, 8,9-EET, 11,12-EET et 14,15-EET), sur les artères, la fonction et la structure cardiaque ainsi que sur la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique (en collaboration avec l'INSERM U1060 à Lyon), et nous administrerons les analogues d'EETs d'intérêts dans ce modèle d'insulino-résistance. En effet, même si cela reste à confirmer, l'inhibition de la sEH pourrait engendrer des effets délétères en favorisant la cancérogenèse ou le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire et le développement d'une approche pharmacologique plus ciblée pourrait permettre d'obtenir les effets protecteurs espérés au plan cardiovasculaire et rénal tout en limitant l'apparition de ces effets secondaires. D'autre part, l'ischémie-reperfusion joue un rôle majeur dans les lésions rénales aiguës présentes en post-transplantation et dans la genèse d'une fibrose interstitielle secondaire. La découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques prévenant la reprise retardée de fonction du greffon et la néphropathie chronique d'allogreffe constitue donc un objectif essentiel. Ainsi, dans la seconde partie de ce projet, nous évaluerons l'impact de l'administration orale chronique du t-AUCB pendant 28 jours sur les conséquences rénales et cardiovasculaires de l'ischémie-reperfusion rénale chez la souris. Ensuite, nous étudierons dans ce même modèle les effets de l'administration intra-vasculaire lors de la reperfusion d'un analogue du 8,9-EET, identifié comme l'isoforme le plus protecteur au niveau rénal, seul ou associé au t-AUCB qui permettra d'augmenter sa biodisponibilité. Lors de ces études, nous évaluerons la fonction endothéliale par des techniques d'artères isolées (coronaires et rénales) en étudiant les relaxations endothélium-dépendantes en réponse à l'acétylcholine en l'absence et en présence d'inhibiteurs de la synthèse du NO et des EETs. La perfusion myocardique, les fonctions cardiaques systoliques et diastoliques seront évaluées par IRM, échocardiographie et cathétérisme. L'expression des protéines régulant le remodelage et l'inflammation seront également mesurés dans les vaisseaux, le cœur et le rein par des techniques

d'immunohistochimie, PCR quantitative, Western blot. Le dosage des différents isoformes d'EETs et des analogues sera réalisé par LC/MS/MS.

Cette recherche devrait apporter les bases fondamentales pour l'utilisation d'agents modulant la voie des EETs en tant que nouvelle approche pharmacologique dans le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales. A ce titre elle se place en parallèle de deux études cliniques réalisées au sein de l'Unité de Pharmacologie Clinique du CHU de Rouen chez des patients diabétiques de type (Diab-EETs) et des patients transplantés rénaux (Transplant-EETs).

**Effet des changements de pratiques agronomiques sur la biodiversité fonctionnelle des sols-  
conséquences sur les stocks de C et la disponibilité de l'azote. (AGROBIOF).**

**Contact** : Michael Aubert, laboratoire ECODIV, Université de Rouen  
Tel : 02 32 76 94 47; e-mail : michael.aubert@univ-rouen.fr

La conservation des sols est une nécessité urgente pour notre agriculture, notre environnement et donc nos sociétés dans la mesure où la pérennité des civilisations est grandement basée sur la capacité des sols à fournir de la nourriture, des fibres et de nombreux autres biens essentiels à l'homme (Wall, 2004). Cette conservation passe par la restauration de leur diversité biologique et des fonctions associées. La réponse agronomique à la nécessité de conservation des sols a pris forme au travers de la mise en place de systèmes de culture innovants. Ces derniers diffèrent des itinéraires culturaux classiques en incluant des techniques culturales alternatives dites "conservatives" moins préjudiciables aux propriétés chimiques, physiques et biologiques des sols (Beninende et al., 2008). Parmi ces pratiques dites "conservatives" du fonctionnement biologique des sols, le semis direct ou le travail réduit du sol, la réduction des intrants chimiques ou encore la rotation de culture intercalant des légumineuses sont les plus répandus (Gal et al., 2007). Concernant l'impact des rotations de cultures, l'effet de l'introduction croissante de légumineuses, pour compenser la diminution des intrants azotés chimiques (Biarnès et al., 2008) a fait l'objet de très peu d'études alors que les effets sur les stocks de C organique et la diversité des sols semblent bénéfiques dans certains contextes (Shah et al, 2010). En effet, en réduisant la fréquence ou les doses des intrants organiques et/ou chimiques, ces techniques affectent le cycle de la matière organique des sols et ses propriétés biologiques (Bending et al., 2004). Il est donc important, pour évaluer les systèmes de culture à bas intrants, d'être en mesure de quantifier leur impact sur (1) la biodiversité des sols y compris dans sa dimension fonctionnelle, (2) la fonction de puits de carbone des sols et (3) les services écosystémiques découlant directement du stockage de C org telle que la stabilité structurale de sols (en lien avec la sensibilité des sols agricoles à l'érosion).

L'impact des techniques culturales classiques tels que le labour ou encore les amendements chimiques et/ou organiques, sur les biocénoses et le fonctionnement du sol ont fait l'objet de nombreuses études (cf. synthèse de Holland (2004) ; van Capelle et al. (2012) et Bronick and Lal (2005). S'il est admis que les biocénoses du sol diffèrent entre labours et pratiques non conventionnelles ou en fonction des associations de culture et/ou de la qualité des apports organiques (Kladivko, 2001 ; Holland, 2004 ; Blanchart et al., 2007 ; Rabary et al., 2008, Pascault et al., 2010), des consensus forts peinent à émerger. Ceci réside essentiellement dans le fait que l'effet d'un changement d'usage des sols et/ou des pratiques culturales n'impacte pas directement les biocénoses du sol mais modifie à la fois les caractéristiques physiques et chimiques des sols (Vargas et al., 2011; Lauber et al., 2008). Qu'ils soient directs ou indirects, ces changements induits dans les communautés biologiques, d'un point de vue structurel et/ou fonctionnel, entraînent des modifications importantes de la dynamique du C organique. La compréhension des mécanismes sous-jacents à ces changements induits constitue un enjeu environnemental et économique majeur pour les exploitations agricoles qui sont soumises à des pressions environnementales croissantes telle que la limitation des intrants (fertilisants minéraux, phytosanitaires).

Le travail de thèse vise donc à caractériser l'impact d'une pratique culturale innovante (introduction de légumineuses dans les rotations agricoles en lien avec la diminution de la fertilisation azotée) sur (i) la diversité des communautés de la macro- et de la mésofaune du sol et (ii) sur le fonctionnement de ce dernier en termes de stockage du C organique et de stabilité structurale. Cette double approche se justifie par le fait que le fonctionnement d'un sol ne se limite pas à une somme de fonctions assurées par chaque catégorie d'organismes, mais est rendu complexe du fait des interactions au sein de et entre les communautés (eg. Moore et al., 2004). Le projet de thèse s'appuiera sur un choix de parcelles issues d'exploitations agricoles de Haute-Normandie dont la gestion représentera une gamme de variabilité suffisante pour tester l'effet de la présence d'une légumineuse précédant immédiatement une culture de blé et l'effet de la présence d'une légumineuse à distance de cette culture de blé en référence, à une rotation monospécifique de blé.

## Déterminisme biotique de l'émergence de la pourriture racinaire du pois et impact de biopesticides

**Contact** : Karine Laval, laboratoire AGTI-TERR, ESITPA  
Tél : 02 32 82 91 44; e-mail : klaval@esitpa.org

Depuis l'après-guerre, le progrès génétique et les innovations proposées par les sociétés semencières et les firmes phytopharmaceutiques ont accompagné le développement de modèles agricoles capables de produire en quantité et en qualité. Cependant, cette évolution ne s'est pas faite sans conséquences, et on mesure aujourd'hui les effets néfastes pour la santé et l'environnement de la systématisation de l'emploi de nombreux produits phytosanitaires. Trouver des solutions pour garantir des rendements élevés en préservant l'environnement constitue un nouvel enjeu de société et l'ensemble des acteurs des territoires doivent s'investir dans cette démarche.

La réceptivité – ou la suppressivité – d'un sol vis-à-vis d'une maladie des plantes cultivées a fait l'objet de nombreuses études ciblant principalement les variables abiotiques de l'écosystème sol/plante/pathogène. Toutefois, l'environnement microbiologique du phytopathogène, par ses causalités agonistes, antagonistes ou prédatrices, influence de façon significative l'émergence de ces maladies. Il est en effet admis que la biodiversité de l'écosystème « sols » dépend à la fois du type de plantes cultivées, des caractéristiques pédologiques mais également des choix agronomiques adoptés, qui vont participer à sélectionner des espèces microbiennes à même de moduler positivement ou négativement l'expression d'une maladie. L'appréhension de la diversité génétique par l'analyse des ADN ribosomiaux couplée aux méthodes d'étude des métagénomés permet aujourd'hui d'envisager la caractérisation des espèces clés modulant les phytopathologies liées, notamment, aux cryptogames (oomycètes, fungi).

Le projet de thèse proposé au GRR VASI s'inscrit dans cette démarche et a pour objectif de modéliser l'expression d'une phytopathologie en regard des cohortes de microorganismes régulateurs de l'expression de cette maladie. Cette analyse sera réalisée in situ en considérant différents contextes agronomiques (itinéraires techniques, variétés de pois, apport de biopesticides/ agents de biocontrôle).

Le travail sera réalisé sur le couple modèle pois/Aphanomyces euteiches. En effet :

(1) le pois doit retrouver sa place comme source de protéines en alimentation animale, en lieu et place du soja dans un objectif de reconquête de notre indépendance en protéines végétales à l'échelle européenne. De plus, introduire du pois dans les rotations permet de limiter les fertilisations azotées pour la culture suivante (Huguet, 2001) (2) /Aphanomyces euteiches/ est un oomycète responsable de la pourriture racinaire du pois. Il peut engendrer des pertes dramatiques de rendement (jusqu'à 100% ) et il n'existe aucun moyen de lutte curative efficace. Sa forme dormante, l'oospore, est stockée dans le sol et reste infectieuse pendant 10 à 20 ans (Gaulin et al., 2007 ; Tivoli et Moussart., 2003). De surcroît, cet oomycète dispose d'unités infectieuses mobiles - les zoospores -, capables de détecter leur plante-hôte à distance. Par conséquent, l'infection par A. euteiches ne dépend pas ou peu des caractéristiques du sol au contraire de la plupart des maladies cryptogamiques (Oyarzun et al., 1997 ; Heyman et al.,2007). (3) Les premières variétés de pois partiellement tolérantes à A. euteiches sont en cours d'inscription mais la plupart des variétés cultivées jusqu'à maintenant ne peuvent enrayer le processus infectieux (Moussart et al.,2008). Ainsi, la seule protection contre le pathogène est le recours à un test de diagnostic de sols, basé sur l'évaluation des nécroses racinaires in planta après 3 semaines de culture en conditions contrôlées. Ce test est largement préconisé par la filière, à défaut d'être effectivement utilisé de façon systématique par les producteurs (Moussart et al., 2006). (4) Ce pathosystème est aujourd'hui bien caractérisé par les équipes BioSol de l'unité AGRITERR et l'équipe GlycoMev de l'Université de Rouen et a, d'ores et déjà, fait l'objet de 2 thèses (Hélène Sauvage (2007) et Marc-Antoine Cannesan (2011)).

Le projet a pour objectif de traiter les questions suivantes:

1. Quels sont les déterminants de la dynamique d'Aphanomyces euteiches /au sein des rotations culturales?\_ Pour répondre à cette question, un dispositif de parcelles expérimentales fédérées par l'organisation des producteurs de légumes (VERT via Bonduelle, avec lequel l'Esitpa est en relation) permettra de mesurer /in situ /la dynamique temporelle du pathogène au regard du cortège microbien dans des conditions d'exploitations au contexte pédoclimatique comparable et à l'itinéraire technique répondant à un cahier des charges défini.

2. Quels sont les déterminants de l'émergence de la maladie? La quantité d'inoculum pathogène sera

mise en regard de l'émergence de la maladie dans un ensemble de 37 parcelles expérimentales mis à disposition du projet par l'INRA. Cet ensemble de parcelles permet d'observer l'évolution du pathogène selon différentes modalités (pédoclimat; rotation des cultures; type de travail du sol; irrigation)

3. Quelles sont les molécules de défense de la plante exprimées en réponse au pathogène? Des variétés de tolérances différentes seront utilisées et l'expression des molécules de défense sera examinée en présence du pathogène.

4. Quels sont les effets de l'apport de biopesticides/agents de biocontrôle (ex. Stifenia, ArabinoGalactane-Protéines, Trichoderma harzianum, Pythium oligandrum, Bacillus subtilis) sur le cycle de développement du pathogène, la réponse immunitaire de la plante et l'émergence de la maladie? Ces agents seront utilisés seuls ou en association pour évaluer un éventuel effet synergique. Les travaux seront réalisés in vitro et/ou in vivo en conditions contrôlées favorables à l'émergence du pathogène.



**Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole: cas du pathosystème  
*Choisya ternata* / *phytophthora* spp**

**Contact** : Maïté Vicré-Gibouin, laboratoire Glyco-MEV, Université de Rouen  
Tél : 02 35 14 67 68; e-mail : Maite.Vicre@univ-rouen.fr

Les travaux de thèse proposés s'inscrivent dans le cadre de la recherche de solutions biologiques efficaces dans la lutte contre les pathogènes du sol. Ce sujet, en lien avec le projet Oranger du Mexique (*Choisya ternata*) focalise sur la protection de cette plante horticole contre les infections causées par les Oomycètes du genre *Phytophthora*. Cette thèse repose sur les compétences de trois partenaires régionaux: l'Institut technique de l'horticulture ASTREDHOR Seine Manche, l'équipe d'Ecologie microbienne des sols de l'Unité AgriTerr de l'ESITPA et le laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale Glyco-MEV de l'Université des Sciences et Techniques de Rouen.

La culture de *Choisya ternata* représente l'une des principales productions horticoles au niveau régional. Toutefois, cette culture ornementale est particulièrement sensible aux pathogènes du sol (dont *Phytophthora* spp) responsables de pertes considérables et d'une dépréciation de la qualité commerciale des plants. Il n'existe à ce jour aucun moyen efficace de lutte chimique de façon préventive ou curative contre les phytophthoras, agents pathogènes majeurs impliqués dans le développement des maladies racinaires. De plus, la nécessité de diminuer les intrants chimiques est un enjeu important pour l'horticulture. Aussi, une meilleure connaissance des interactions plantes/pathogènes/agents de lutte biologique en contexte horticole s'avère indispensable pour l'élaboration de nouveaux moyens de lutte biologique contre les maladies engendrées par *phytophthora* spp. Par ailleurs, des essais préliminaires ont montré l'intérêt d'agents biologiques dans le contrôle de la maladie, qui feront l'objet d'attentions particulières dans le cadre de ce projet de thèse.

Ce projet se décline en 3 axes de recherche complémentaires : (1) Appréhender les mécanismes d'interaction entre la plante et le(s) pathogène(s). Cet axe vise à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les étapes précoces d'infection comprenant l'adhésion et la progression de(s) organisme(s) pathogène(s) dans le système racinaire des plantes infectées. Cette phase du projet nécessite des étapes de mise au point qui ont été décrites avec précision dans le projet "Oranger du Mexique" et qui feront l'objet du travail de la première année de la thèse. Il s'agira de développer des outils de détection et de suivi des populations pathogènes in situ (dans le sol et la plante) et des méthodes innovantes pour l'observation des mécanismes d'infection des plantes par le pathogène. (2) Evaluer le rôle des cortèges microbiens naturellement présents dans les substrats. Ce deuxième axe a pour objectif d'apporter des éléments de compréhension sur l'incidence des types de matrice de culture caractéristiques des cultures horticoles sur la réponse des plantes à l'infection et ainsi de mieux appréhender les phénomènes de réceptivité des matrices de culture aux maladies. (3) Evaluer le rôle des facteurs de conduites culturales et l'action d'agents de lutte biologique sur les populations de pathogènes. Les agents de lutte biologique identifiés à ce jour sont *Trichoderma harzianum* et *Glomus intraradices* commercialisés respectivement sous les acronymes Trianum et Ithec. Cet axe portant sur la biotisation des substrats horticoles permettra de déterminer les agents les plus efficaces et de déterminer leurs conditions d'utilisation.

Ce travail de thèse fait appel à une approche transdisciplinaire, y compris du point de vue des outils qui devront être déployés. La détection, la quantification et le suivi des pathogènes, du cortège microbien et des microorganismes antagonistes dans le sol, les substrats et la plante seront réalisés par une approche moléculaire (Sauvage et al., 2007; Robideau et al., 2011). Dans une perspective de transférabilité des outils de détection et quantification produits, une démarche particulièrement innovante, mettant en œuvre la spectroscopie infrarouge sera développée en parallèle de l'outil moléculaire (Mariey et al, 2000; Salman et al., 2012). Les interactions plante/pathogène seront étudiées par des examens macro- et micro-scopiques, l'immunolocalisation des polymères pariétaux des cellules racinaires et des hyphes, la quantification des cellules bordantes (Hawes et al., 2000; Driouich et al., 2010), des tests de viabilité cellulaire (microscopie, cytométrie en flux) et des tests in vitro sur le cycle de développement du pathogène (Durand et al, 2009; Cannesan et al., 2012).

La compréhension des interactions plante/substrat/pathogènes/organismes antagonistes permise par ce projet devrait contribuer à la mise en place et au développement de nouveaux moyens

de lutte biologique et à l'identification d'agents biologiques les plus prometteurs dans le contrôle du pathogène contre les maladies racinaires du choysia.

**Expression et rôles du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigX dans l'adaptation à son environnement, la formation de biofilm et la réponse aux antimicrobiens du pathogène opportuniste de l'homme *Pseudomonas aeruginosa***

**Contact** : Sylvie Chevalier, LMSM EA4312, Université de Rouen  
Tél : 02 32 29 15 60; e-mail : sylvie.chevalier@univ-rouen.fr

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, pathogène opportuniste de l'homme, qui est impliqué dans de nombreuses infections nosocomiales et dans la sévérité des symptômes liés à la mucoviscidose. L'expression du caractère pathogène est dépendante de sa capacité à percevoir des stimuli environnementaux et à les transmettre à des éléments induisant l'expression de facteurs de virulence via un réseau de régulation complexe. Un des modes classiques d'adaptation se fait au travers de l'utilisation différentielle de facteurs sigma, sous unités transitoires de l'ARN polymérase, nécessaires pour la guider vers les promoteurs de certains gènes et en initier la transcription. En plus des facteurs sigma primaires, *P. aeruginosa* possède de nombreux facteurs sigma alternatifs, parmi lesquels 19 facteurs sigma à fonction extra-cytoplasmiques (ECFs). Ces derniers sont activés spécifiquement en réponse à des stress, et induisent la transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans la réponse à ces stimuli. A ce jour, seuls 13 représentants ont été caractérisés, la majorité intervenant dans des mécanismes complexes de captation de fer. Dans le cadre de cette thèse, nous proposons d'étudier le facteur sigma ECF SigX, encore méconnu chez *P. aeruginosa*. SigX présente des similarités de séquence élevées avec SigX et SigW de *Bacillus subtilis* et SigV d'*Enterococcus faecalis* qui sont, à la différence de *P. aeruginosa*, des germes à Gram positif. Ces 3 facteurs sigma ECF sont impliqués dans la réponse de la bactérie face à des agents anti-infectieux qui ciblent l'élément principal de leur paroi, à savoir le peptidoglycane. Chez *P. aeruginosa*, SigX est principalement décrit comme responsable de l'expression d'OprF, les deux gènes étant cotranscrits, ce qui suggère un lien fonctionnel fort entre les deux protéines. OprF est la porine majoritaire aspécifique de ce germe. Exprimée partiellement en surface de la bactérie, OprF assure la fonction de récepteur des interférons gamma, qui permet à *P. aeruginosa* de percevoir l'état du système immunitaire de son hôte. Cette interaction est perçue comme un signal par la bactérie, qui est transduit jusqu'au niveau du cytoplasme, et qui se traduit par l'expression de ses principaux facteurs de virulence, entraînant la bactérie vers un processus de virulence aiguë. OprF est donc considérée comme un système senseur de surface cellulaire, et est nécessaire à l'expression de la virulence de *P. aeruginosa*. C'est également une protéine structurale, présente à raison de 200 000 copies par cellule, ancrant la membrane externe sur le peptidoglycane et participant ainsi au maintien de l'intégrité de l'enveloppe. En accord avec l'importance d'OprF, son expression est finement régulée, essentiellement par SigX au niveau transcriptionnel et dans une moindre mesure dans nos conditions par AlgU. AlgU est un facteur sigma ECF particulièrement étudié en raison de i) son implication dans la conversion mucoïde et la formation de biofilms, et ii) son homologie avec le facteur de réponse générale aux stress de l'enveloppe sigmaE chez *E. coli*. L'analyse comparative des transcriptomes issus d'une souche sauvage et d'un mutant sigX, montre une sous-expression des gènes codant les enzymes impliquées dans i) la biosynthèse du peptidoglycane, ii) le métabolisme des lipides, et des porines, suggérant que SigX, tout comme AlgU, pourrait être impliqué dans le maintien de l'intégrité pariétale. De plus, l'altération de l'expression de nombreux régulateurs dans le mutant sigX suggère que SigX pourrait faire partie des régulateurs maîtres de *P. aeruginosa*. Le projet de thèse proposé s'inscrit dans la poursuite des travaux initiés au laboratoire en 2010 (thèse de G. Gicquel cofinancée par la région Haute Normandie et le LMSM). Il a pour objectifs principaux :

- (1) de décrypter les mécanismes de régulation de l'expression de SigX chez *P. aeruginosa*. L'identification des sites d'initiation de la transcription sera effectuée par Race-PCR. L'expression de sigX sera étudiée grâce à une technique basée sur un système de gène rapporteur,
- (2) de comprendre les mécanismes de régulation de son activité. L'activité de la grande majorité des facteurs sigma est régulée par un facteur antisigma, qui piège le facteur sigma, l'empêchant ainsi d'interagir avec l'ARN polymérase. Ce mécanisme permet à la bactérie de réagir rapidement face à un stress extracytoplasmique, le facteur sigma étant disponible dans la cellule. Une stratégie basée sur une mutagenèse aléatoire par transposition de *P. aeruginosa* contenant un vecteur rapporteur de l'activité de SigX sera utilisée,
- (3) de rechercher des signaux conduisant à l'activation de l'expression de SigX et de son régulon.

Les facteurs sigma ECFs sont impliqués dans l'adaptation des bactéries à leur environnement, ce qui suggère que leur propre expression et celle de leur régulon sont dépendantes de ces conditions environnementales. La transcription de sigX et de quelques unes de ses cibles sera évaluée dans de nombreuses conditions environnementales. Une attention particulière sera consacrée aux agents antimicrobiens qui ciblent l'enveloppe (antibiotiques, détergents, peptides antimicrobiens),

(4) de préciser le rôle de SigX dans la formation de biofilms et dans le remodelage de l'enveloppe en réponse à différentes conditions stressantes. Une attention particulière sera portée aux agents antimicrobiens. La réponse de *P. aeruginosa* face à certains stress, préalablement validés comme activant l'expression de SigX et de son régulon, sera évaluée par analyse transcriptomique. In fine, la compréhension de ces mécanismes pourrait permettre de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques, visant à empêcher la bactérie de modifier son enveloppe en réponse à son environnement, la sensibilisant à une action combinée avec des antimicrobiens.