



Appel à candidatures postes d'accueil 2015

«Ecole Centrale Paris, Institut Pasteur, Réseau International des Instituts Pasteur, Ecole Polytechnique, Arts et Métiers ParisTech, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, Université de Technologie de Compiègne, CEA, Labex BioPsy, AP-HP»

Postes d'accueil pour Internes, Assistants Hospitalo-Universitaires, Chefs de Clinique Assistants

Dans le cadre de votre pratique clinique vous avez été confronté(e)s à la limitation du savoir biomédical ou à un besoin technologique. Vous avez identifié une problématique et avez réfléchi, en conséquence, à un projet innovant à visée « translationnelle ».

Nous vous proposons d'aller jusqu'au bout de votre démarche en l'inscrivant dans le cadre d'un partenariat entre l'AP-HP et l'un de ses prestigieux partenaires, partenariat qui se traduit par le présent appel à candidatures aux postes d'accueil 2015.

Vous aurez non seulement le privilège de réaliser votre apprentissage de la recherche fondamentale et préclinique auprès de chercheurs et ingénieurs d'excellence, mais aussi l'opportunité de tisser des liens, à plus long terme, avec eux. Au-delà du cadre de ce poste d'accueil, vous vous donnerez les moyens à l'avenir, de mettre au service du patient non seulement votre expertise clinique mais aussi vos capacités d'investigation scientifique en identifiant des problèmes et en élaborant des solutions en équipe clinicien-chercheur.

Ces postes d'accueil sont destinés, aux internes, aux assistants hospitalo-universitaires, aux chefs de clinique assistants : docteurs en médecine, docteurs en pharmacie, ou en odontologie, de l'AP-HP, titulaires d'un DES et d'un master2 recherche, inscrits à l'ordre dont ils dépendent à la date de prise de leurs fonctions, souhaitant initier ou poursuivre un projet de recherche dans :

- **Un laboratoire de recherche de l'Ecole Centrale Paris :**

<http://www.ecp.fr/home/Recherche/Laboratoires>

- **Un laboratoire de recherche de l'Institut Pasteur ou du réseau international des Instituts Pasteur:**

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/recherche/departements-scientifiques>

<http://www.pasteur.fr/fr/international/le-reseau-international-instituts-pasteur/les-instituts-du-riip>

- **Un laboratoire de recherche de l'Ecole Polytechnique:**

<http://www.polytechnique.edu/des-laboratoires-scientifiques-de-pointe>

- **Un laboratoire de recherche d'Arts et Métiers ParisTech (ENSAM) :**

http://www.ensam.fr/fr/recherche/les_laboratoires

- **Un laboratoire de recherche de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris (ESPCI ParisTech) :**

<http://www.espci.fr/fr/recherche/laboratoires/>

- **Un laboratoire de recherche d'une unité de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC) :**

<http://www.utc.fr/unites-recherche/index.php>

- **un laboratoire de recherche d'une unité des 9 instituts de la direction des sciences du vivant du CEA :**

<http://www-dsv cea.fr/dsv/instituts>

- **Un laboratoire de recherche du Labex BioPsy:**

<http://www.biopsy.fr>

Durée du contrat : CDD d'un an, à plein temps, reconductible un an sous condition d'une audition annuelle, il ne s'agit pas d'une reconduction tacite.

Date limite de soumission des candidatures: 2 mars 2015

- La sélection des candidats comporte un examen du dossier de candidature avec expertises externes et une audition par un jury composé de représentants des organismes partenaires. **Les auditions auront lieu en juin 2015, les résultats seront disponibles fin juin 2015.**

- Le Comité d'Evaluation et de Diffusion des Innovations Technologiques (CEDIT) de l'AP-HP, agence hospitalière d'évaluation des technologies de santé innovantes siège dans le jury Postes d'Accueil (cf. annexe en dernière page du dossier).

- Les critères de sélection des candidats sont les suivants :

- cursus du candidat et projet professionnel envisagé après le poste d'accueil
- qualité scientifique du projet présenté et faisabilité dans le laboratoire d'accueil
- seront privilégiées les candidatures s'inscrivant dans une approche trans-disciplinaire
- le cas échéant, potentiel de valorisation économique du projet

- Prise de fonction : **1^{er} novembre 2015**

Contacts :

Institut Pasteur Geneviève MILON Tél : 06 70 81 89 69 genevieve.milon@pasteur.fr	Ecole Centrale Paris Evren SAHIN Tél : 06 09 31 70 74 E-mail : evren.sahin@ecp.fr
CEA Philippe HANTRAYE Tél : 01 46 54 83 67 philippe.hantraye@cea.fr	Arts et Métiers ParisTech Philippe ROUCH Tél : 01 44 24 63 64 philippe.rouch@ensam.eu
LABEX BioPsy Brigitte BOUCHARD Tél : 01 45 87 61 44 brigitte.bouchard@inserm.fr	UTC Cécile LEGALLAIS Tel : 03 44 23 46 70 cecile.legallais@utc.fr
ESPCI ParisTech Jean -Baptiste HENNEQUIN Tél : 01 40 79 59 25 jean-baptiste.hennequin@espci.fr	Ecole Polytechnique Jean-Marc STEYEART Tél : 01 77 57 80 72 steyaert@lix.polytechnique.fr
AP-HP Marie-Agnès LEFEVRE Tél. : 01 44 84 17 69 marie-agnes.lefevre@drc.aphp.fr Francois Bassompierre Tél : 01 44 84 17 28 francois.bassompierre@sls.aphp.fr CEDIT : Alexandre BARNA Tél. : 01 44 27 31 80 alexandre.barna@sap.aphp.fr	

Le dossier de candidature devra être transmis par courriel à :

evren.sahin@ecp.fr
philippe.hantraye@cea.fr
brigitte.bouchard@inserm.fr
steyaert@lix.polytechnique.fr
marie-agnes.lefevre@drc.aphp.fr
genevieve.milon@pasteur.fr
alexandre.barna@sap.aphp.fr
cecile.legallais@utc.fr
philippe.rouch@ensam.eu
jean-baptiste.hennequin@espci.fr

Date limite de soumission des dossiers de candidatures : 2 mars 2015

Documents à joindre - impérativement - au dossier de candidature :

- 1) Copie du diplôme de docteur en médecine ou pharmacie ou odontologie
- 2) Copie du diplôme de master2 recherche,
- 3) Copie du DES
- 4) Curriculum vitae du candidat :
 - cursus hospitalier,
 - activités antérieures de recherche
 - joindre une liste des principales publications (revues à comité de lecture)
- 5) Lettre de motivation
- 6) Lettre d'accord du responsable du laboratoire d'accueil

INSTRUCTIONS AUX CANDIDAT(E)S

Ces postes d'accueil sont destinés - uniquement - aux docteurs en médecine, aux docteurs en pharmacie, aux docteurs en odontologie de l'**AP-HP** titulaires d'un DES et d'un master2 recherche ; inscrits à l'ordre dont les candidat(e)s dépendent à la date de prise de leurs fonctions.

Préparation du dossier de demande/réponse :

- Nommer votre dossier (format Word) selon le modèle suivant : accueil15_Nom_AAAAMMJJ : la date est celle de la dernière modification du dossier
- Préparer un **Zip** du même nom que votre dossier (accueil15_Nom_AAAAMMJJ.zip)

Adresser votre dossier au plus tard le 2 mars 2015

Sous format électronique aux adresses électroniques précitées en mentionnant impérativement en objet du mail «accueil_Nom »

La confirmation de réception est de votre responsabilité. Pour les courriels, utiliser l'outil «demander une confirmation de lecture» lors de l'envoi et conserver le mail de confirmation.

Dossier de candidature

- NOM et Prénom du candidat : **GEOFFROY Pierre Alexis**

- Statut professionnel : **Médecin, PHA**

- Age : **30 ans**

- Service hospitalier actuel à l'AP-HP : **Centre Expert des Troubles Bipolaires de la Fondation FondaMental**

- Hôpital : **Fernand Widal, APHP**

- Groupe hospitalier : **Saint-Louis – Lariboisière - Fernand Widal**

- **Laboratoire d'accueil :**

☐ Ecole Centrale Paris ☐ Institut Pasteur ☐ Ecole Polytechnique ☐ Arts et Métiers ParisTech ☐ UTC

☐ ESPCI ParisTech ☐ CEA ☒ Labex BioPsy ☐ Réseau International des Instituts Pasteur

- Intitulé précis et adresse du laboratoire d'accueil :

Centre Expert Bipolaires de la Fondation FondaMental & unité INSERM UMR-S 1144

Service de Psychiatrie Adulte (Pr F. Bellivier), Hôpital Fernand Widal

200, rue du Fg Saint-Denis 75465 Paris Cedex 10

- Demande de renouvellement ☒ oui ☐ non

- Intitulé du projet de recherche :

Signature moléculaire de la réponse au Lithium dans le Trouble Bipolaire : étude de la régulation de l'expression des gènes circadiens.

- POUR LES DEMANDES DE RENOUVELLEMENT :

→ **Transmettre uniquement un état d'avancement du projet -**

(Avec notamment éventuelles difficultés rencontrées, éventuelles modifications apportées au projet, échéancier précis du projet pour l'année faisant l'objet de la demande de renouvellement, publications, dépôt de brevets, naissances)

- DEMANDES DE RENOUVELLEMENT -

ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET

PLAN

I) ÉLEMENTS DE FAISABILITE

II) AVANCEMENT DU PROJET

A. ETUDE DU TRANSCRIPTOME SPECIFIQUE

I. Conception d'amorces pour les gènes d'études

II. Tests de ces amorces

III. Premier point de cinétique à j4

IV. Analyses exploratoires qualitatives des puces Affymetrix

B. ETUDES EPIGENETIQUES

III) DIFFICULTES

IV) MODIFICATIONS APPORTEES AU PROJET

V) PUBLICATIONS

DETAILS DE L'ÉTAT D'AVANCEMENT DU PROJET

I) RAPPEL BREF DU CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Le trouble bipolaire (TB) est une pathologie sévère et fréquente caractérisée par des épisodes dépressifs majeurs et maniaques. Le TB se caractérise par un taux élevé de récurrences des épisodes de l'humeur avec 70 à 80% de rechutes en moyenne à 2 ans après un épisode majeur et ce malgré le traitement prophylactique. Le lithium (Li) est le traitement de référence et de première ligne pour la prévention de ces rechutes toutes polarités confondues. C'est également le seul traitement qui a montré une efficacité sur la prévention du risque suicidaire et sur la réduction du risque de mortalité toutes causes confondues chez des sujets souffrant de TB.

À ce jour, il n'existe pas de marqueurs prédictifs fiables de la réponse au Li qui pourraient aider à distinguer les patients répondeurs des patients non-répondeurs.

Mon projet de recherche s'inscrit dans le contexte de la recherche de biomarqueurs associés à la réponse au Li. Il porte plus précisément sur l'étude de la régulation de l'expression des gènes circadiens dans la réponse prophylactique au Li. Deux éléments principaux sous-tendent mon projet scientifique : (i) il existe de nombreux arguments pour poser l'hypothèse de l'implication des gènes circadiens dans la réponse au Li, (ii) peu de données de la littérature explorent l'existence d'associations entre la réponse au Li et la régulation de l'expression des gènes circadiens.

Les études exploratoires *in vitro* seront confirmées par des études à partir de matériel collecté *in vivo*. Les résultats ainsi obtenus auront un haut potentiel de transfert en clinique.

II) ÉLÉMENTS DE FAISABILITE

Le projet a débuté en novembre 2014 et a confirmé plusieurs éléments de faisabilité encourageants :

- Mon intégration en tant que clinicien au sein de mon équipe d'accueil de biologie moléculaire dirigée par le Dr C Marie-Claire (CR1 CNRS, INSERM UMR S-1144) s'est très bien déroulée. L'équipe s'est montrée accueillante et particulièrement stimulante, notamment en terme des interactions recherche clinique/recherche fondamentale.
- Durant les deux premiers mois de ce doctorat, j'ai bénéficié d'une formation intensive en biologie moléculaire sur les protocoles de reverse transcription et de PCR quantitative en temps réel, ainsi que du design d'amorces. J'ai aussi été formé à plusieurs logiciels tels que SDS et Oligo7 (qui permettent ???).
- Le projet bénéficie d'un financement actif et suffisant (Pr F. Bellivier, prix Marcel Dassault), et nous avons également répondu à un nouvel appel d'offre pour 2016 (FRM, « Urgences de la recherche » ciblé sur la physiopathologie des maladies psychiatriques).
- Le projet bénéficie de l'expertise en biologie cellulaire et moléculaire de Mme Cindie Courtin (Ingénieure d'étude, Université Paris Descartes).
- Le projet bénéficie par ailleurs de l'aide, ou de l'apport d'étudiants. Ainsi, de novembre 2014 à janvier 2015, Thomas Morvillers (BTS *bioanalyse et contrôle*) a pu participer aux expériences. D'autre part, il est prévu qu'une étudiante en Master 2, Julia Maruani, contribue à ce même protocole de novembre 2015 à octobre 2016.

Commentaire [BB1]: Nov-mars = mois, tu mentionnes deux mois est-ce en raison des délais liés au pb de l'appareil à PCR ? si oui, je ne le ferai pas apparaître ici...

III) AVANCEMENT DU PROJET

A. ETUDE DU TRANSCRIPTOME SPECIFIQUE

Pour mémoire, cette partie de mon projet s'intéresse au transcriptome de gènes centraux de l'horloge biologique interne, sélectionnés en fonction de résultats antérieurs de mon équipe d'accueil ou de la littérature ou sur l'importance de leur rôle fonctionnel. J'ai choisi ainsi de porter mon attention sur 21 gènes circadiens (*GSK3B*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *RORA*, *RORB*, *RORC*, *CLOCK*, *ARNTL*, *ARNTL2*, *TIMELESS*, *CRY1*, *CRY2*, *NPAS2*, *BHLHE40*, *PPARGC1A*, *BHLHE41*, *NR1D1*, *CSNK1D*, *CSNK1E*, *DBP*) et sur 4 gènes de la voie de synthèse et récepteurs de la mélatonine (*MTNR1A*, *MTNR1B*, *AANAT*, *ASMT*).

L'objectif est de tester l'existence de différence de taux d'expression de ces gènes candidats entre des lignées lymphoblastoïdes issues de patients souffrant de troubles bipolaires (TB) répondeurs et non répondeurs au Lithium (Li). Les patients sont évalués rétrospectivement pour leur réponse thérapeutique au Li par l'échelle ALDA qui permet de définir des groupes contrastés de réponse au Li : LiER (score total >6) et LiNR (score total <2).

L'expression des gènes circadiens est évaluée en l'absence puis en présence de Li (1 mM) dans le milieu de culture des lignées (J4, J8 et J15) par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).

Cette première partie du travail doit me permettre d'identifier les gènes candidats qui sont différentiellement exprimés entre les patients LiER et LiNR, ainsi que ceux dont l'expression est modulée par le Li dans chacun de ces deux groupes de patients.

I. Conception d'amorces pour les gènes d'études

La première étape a été la conception d'amorces (ou « primers ») qui vont permettre d'amplifier de façon spécifique les gènes d'intérêt en utilisant la technique de PCR quantitative en temps réel.

En accord avec la méthodologie en place au laboratoire, nous avons fait le choix d'une détection grâce à la chimie SYBER-green®. Ceci présente l'avantage de permettre une excellente continuité entre les résultats précédemment acquis au laboratoire et ceux de mon travail de thèse. Par ailleurs, comme nous étudions 25 gènes de manière exploratoire, cette chimie présente l'avantage d'être peu coûteuse (20€ en moyenne par couple d'amorces avec la chimie SYBER-green® et 200€ par exemple avec la technique par sonde TaqMan® qui est l'autre méthode de détection la plus utilisée).

En pratique, j'ai tout d'abord été formé à la manipulation et l'extraction de données à partir des différentes bases de données du NCBI afin de pouvoir

- Télécharger les séquences génomiques de chacun des 25 gènes à partir de *GENE* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).
- Utiliser *Nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) pour obtenir l'organisation exons-introns, les positions nucléotidiques de chaque gène et vérifier la présence d'isoformes et de pseudogènes.

Puis, j'ai conçu les couples d'amorces (sens et anti-sens) sur le logiciel Oligo® (version 7) à l'utilisation duquel j'ai été formé préalablement par le Dr C Marie-Claire. Afin d'éviter l'amplification de produits de PCR non spécifiques (ADNg, pseudogènes, contaminations, etc) mais aussi de dimères d'amorces, plusieurs paramètres ont été pris en compte :

- Les amorces sont positionnées de part et d'autre d'introns >1000 pb quand c'est possible. Afin de favoriser, lors des étapes d'amplification très rapides (45 sec), les produits de PCR courts (issus de l'ADNc de l'ARNm mature).
- La stabilité interne des amorces
- l'absence de formation de dimères stables ($\Delta G < -5 \text{ kcal}$)
- l'absence de plus de 5 appariements consécutifs intra-ou inter-amorces
- Une température de fusion théorique (T_m) >71°C.

Enfin, à l'aide de l'algorithme de comparaison et d'alignement de séquences *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nous avons vérifié que chaque couple d'amorces était bien spécifique du gène d'intérêt.

Par précaution, j'ai effectué le design de deux couples d'amorces pour chaque gène (soit 50 couples pour 25 gènes) afin de ne garder que le couple qui détecte le mieux (dans nos conditions) l'expression des gènes d'intérêt.

II. Tests de ces amorces

Cette étape a pour objectif de sélectionner le couple d'amorces qui fonctionne le mieux, mais aussi de confirmer que les 25 gènes sont bien exprimés dans les cellules lymphoblastoïdes. Dans les bases de données ces 25 gènes sont prédits comme étant exprimés dans certaines cellules du sang (<http://www.genecards.org>). Les lignées lymphoblastoïdes que nous utilisons sont issues de lymphocytes B mais ont été transformées par le virus d'Epstein-Barr ce qui peut modifier les niveaux d'expression de certains gènes. Il est donc nécessaire de vérifier si, dans nos lignées, les 25 gènes sont exprimés et détectables. En parallèle, nous avons testé les amorces sur des échantillons d'ARN de cerveau commerciaux (Clontech®) afin d'avoir un contrôle positif.

La qPCR a été réalisée à l'aide de l'instrument 7900HT™ (Applied Biosystems®) présent sur la plateforme de PCR quantitative de la faculté de pharmacie et les données ont été analysées à l'aide du logiciel SDS 2.4. Le produit de PCR est détecté en suivant la fluorescence du SYBER-green® qui devient fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Afin de vérifier la spécificité de la détection, une courbe de fusion est réalisée en fin de PCR en faisant varier la température de l'échantillon. La température de fusion ou T_m (définie comme le maximum de la dérivée de la fluorescence) dépend de la taille et de la séquence du produit de PCR et est donc très spécifique.

Nous avons évalué le niveau d'expression pour chaque gène et effectué les contrôles suivants :

- contrôle à chaque réaction de la présence d'un seul produit PCR par évaluation de la température de fusion (T_m) du produit de PCR à l'aide de la courbe de fusion. C'est à dire que nous avons contrôlé la présence d'un seul produit de PCR qui présentait la bonne T_m .

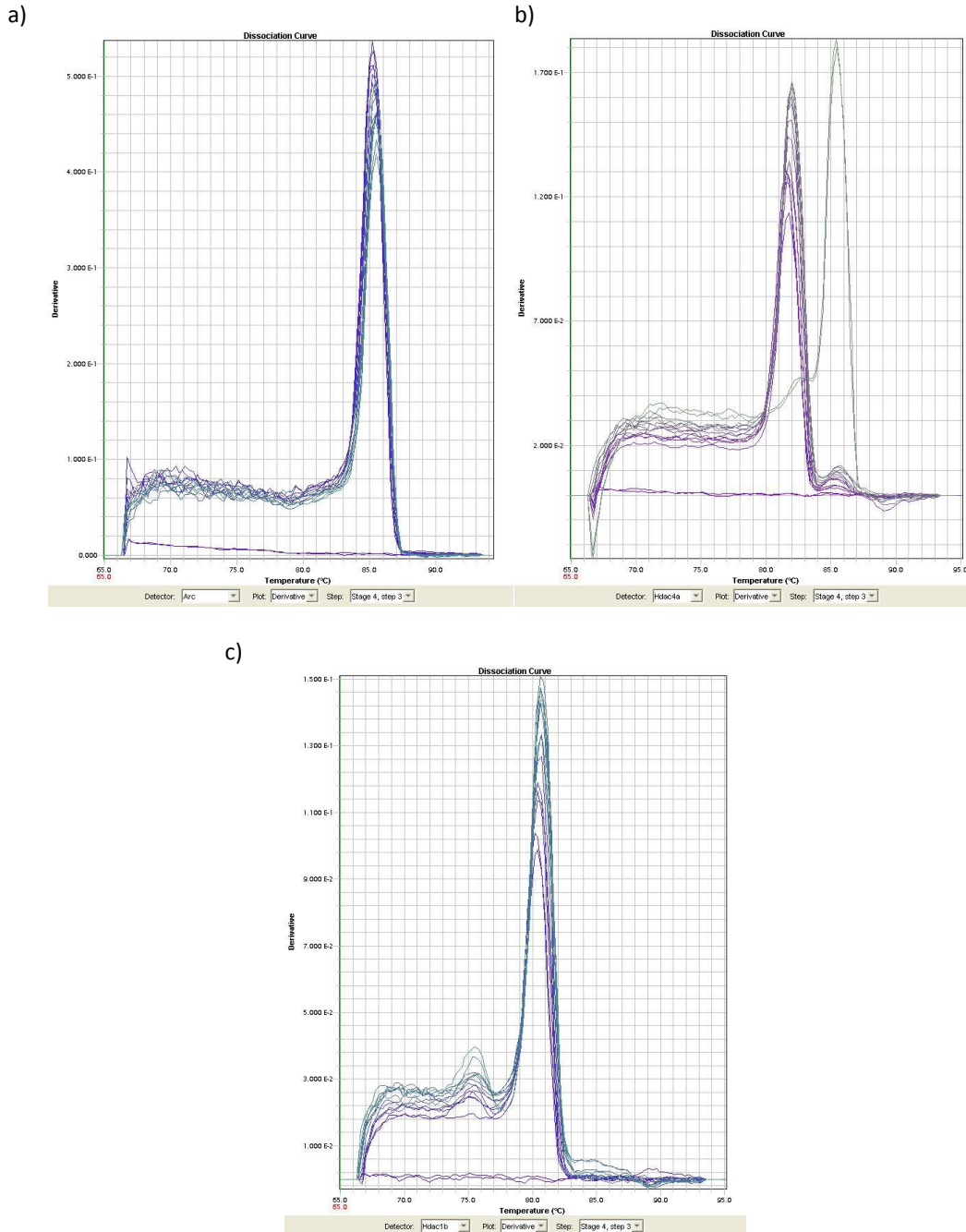
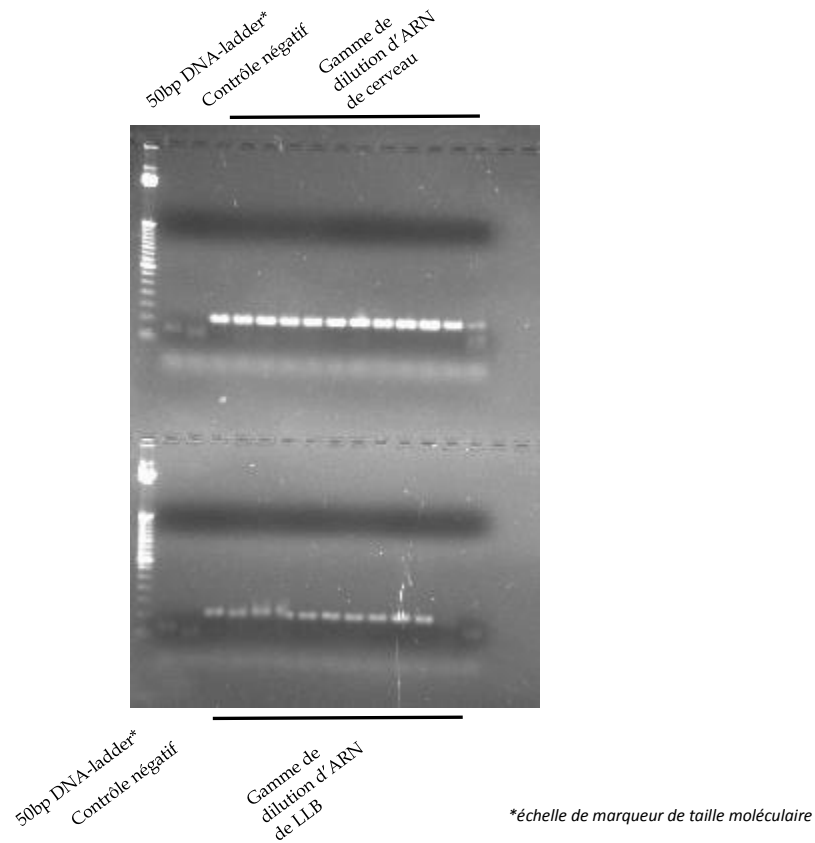


Figure 1 : Exemples de courbes de fusion obtenues : a) une seule T_m (un seul produit de PCR) b) deux T_m (2 produits de PCR) c) avec des dimères d'amorces (les amorces se dimèrisent entre elles plutôt que d'amplifier l'ADN).

- De plus nous avons également contrôlé sur gel d'agarose la présence d'une seule bande lors de la mise au point, c'est à dire que les amorces n'amplifient qu'un produit.
(cf exemple ci-dessous, avec en haut les lignées de cerveau et en bas les lignées lymphoblastoïdes)



Par ailleurs, pour mon projet nous allons également utiliser deux gènes de référence (*SDHA*, *HPRT*). Ces gènes ont déjà été montrés au laboratoire comme étant des gènes dont l'expression ne varie pas dans les lignées lymphoblastoïdes en présence de Li.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les niveaux d'expression des 25 gènes testés dans le cerveau et dans les lignées lymphoblastoïdes :

GENES	CERVEAU	LIGNEES LYMPHOBLASTOÏDES
<i>CLOCK</i>	++	++
<i>ARNTL</i>	+++	+++
<i>ARNTL2</i>	++	++
<i>PER1</i>	+++	+++
<i>PER2</i>	++	++
<i>PER3</i>	++	+
<i>RORA</i>	+++	+++
<i>RORB</i>	++	-
<i>RORC</i>	++	-
<i>GSK3b</i>	++	++
<i>TIMELESS</i>	+	++
<i>CRY1</i>	++	+++
<i>CRY2</i>	+++	++
<i>NPAS2</i>	+++	-
<i>BHLHE40</i>	+++	++
<i>BHLHE41</i>	+++	+
<i>PPARGC1A</i>	++	-
<i>NR1D1</i>	+++	++
<i>CSNK1D</i>	+++	++
<i>CSNK1E</i>	+++	+++
<i>DBP</i>	+++	+
<i>AANAT</i>	-	++
<i>ASMT</i>	-	++
<i>MTNR1A</i>	-	-
<i>MTNR1B</i>	-	-
GÈNES DE REFERENCE		
<i>SDHA</i>	++	++
<i>HPRT</i>	++	++

Tableau 1 : récapitulatif des niveaux d'expression dans les lignées lymphoblastoïdes des 25 gènes circadiens et mélatoninergiques testés. Les gènes écrits en vert sont ceux pour lesquels nous avons pu déterminer un niveau d'expression satisfaisant pour la poursuite des travaux.

Toutes ces étapes de mise au point et de contrôle nous ont permis de retenir 17 couples d'amorces amplifiant de façon satisfaisante (spécificité et efficacité) 17 gènes circadiens dont l'expression est suffisante pour être détectée dans les lignées lymphoblastoïdes. Nous allons utiliser les échantillons de cerveau commerciaux afin de réaliser une courbe standard qui permettra la quantification relative des taux d'expression des gènes d'intérêt dans les lignées lymphoblastoïdes.

III. Premier point de cinétique à j4

L'expression des gènes circadiens est évaluée en l'absence et en présence de Li (1 mM) dans le milieu de culture (J4, J8 et J15) par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). L'analyse de chaque transcrit (n=17) comprend une comparaison des 4 cinétiques : LiER avec et sans Li, LiNR avec et sans Li. Ainsi, en plus des comparaisons entre LiER et LiNR, pour chaque point de mesure le sujet est son propre témoin pour les conditions avec et sans Li.

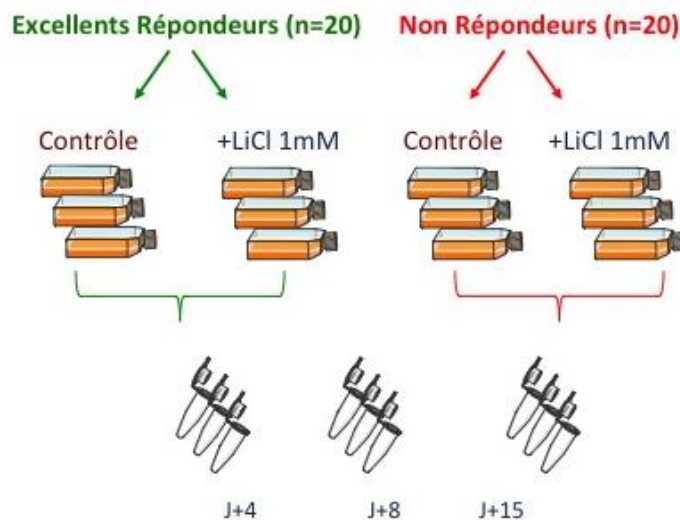


Figure 2 : Schéma résumant l'organisation de la comparaison des 4 cinétiques.

Plusieurs étapes ont été réalisées avant le début de mon projet de thèse : (i) la sélection des 40 lignées cellulaires (LiER et LiNR) sur la base des caractéristiques cliniques et démographiques des patients ; (ii) les mises au point techniques sur un petit nombre de lignées ; (iii) L'ajustement temporel des conditions de culture ; (iv) les cultures cellulaires des 40 lignées pour J4, J8 et J15 ont été réalisées, puis l'ARN a été extrait par Cindie Courtin.

Je me suis d'abord concentré sur le premier point de cinétique (j4) et ainsi j'ai réalisé 2 étapes afin d'évaluer l'expression de ces gènes circadiens : (i) une étape de transcription inverse (RT) d'ARN en ADNc, (ii) une étape de quantification en temps réel de cet ARN rétro-transcrit (RT-PCR).

(i) Étape 1 : reverse transcription ou transcription inverse

Cette étape de reverse transcription (RT) se fait à l'aide d'une reverse transcriptase qui est une enzyme rétrovirale permettant la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire en partant d'un ARN comme matrice. Une amorce pour la transcription inverse est nécessaire, et nous avons utilisé des amorces hexamères aléatoires (« Random Primers ») de 6 nucléotides, constitués d'un mélange d'oligonucléotides représentatif de toutes les séquences possibles d'hexamères. Cette méthode présente l'avantage de nécessiter une seule RT pour l'amplification de plusieurs gènes d'intérêt.

L'ARN est une molécule fragile sensible à la température mais aussi aux RNAses présentes sur la peau ou dans la poussière qui pourraient le dégrader. Il est donc nécessaire de travailler en conditions dites « RNase Free » (décontamination des surfaces de travail et instruments, utilisation

de cônes avec filtre, stérilisation de tout le matériel, port de gants, travail sur la glace ou avec des portoirs réfrigérés...). Tout ce paragraphe est un peu de la « cuisine » qui ne me paraît pas spécialement spécifique au projet donc peu intéressant, faire plus court ;

Le mélange réactionnel ou « mix » est la préparation que nous utilisons permettant de réaliser la RT. Afin de pouvoir comparer les échantillons il est important de préparer un seul « mix » pour tous les échantillons J4 qui vont être comparés (LiER +/- Li et LiNR +/- Li). Par ailleurs pour une quantification correcte puis une comparaison, il faut qu'une même quantité d'ARN pour tous les échantillons soit rétro-transcrite. Dans notre cas, nous avons effectué la RT à partir de 1µg d'ARN total extraits à partir de lignées lymphoblastoïdes incubées ou non avec 1mM de Li pendant 4 jours. Puis tous les échantillons sont passés ensemble dans le thermocycleur pour :

1. Une étape d'hybridation des hexamères (25°C pendant 10min).
2. Une étape de synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN (42°C pendant 30min).
3. Une inactivation de la reverse transcriptase (99°C pendant 5min).

L'ADNc obtenu en fin de réaction est une molécule simple brin qui est fragile. Afin d'éviter les cycles de congélation/décongélation, chaque tube de 25 µl de RT a été aliquoté en 4 tubes qui sont stockés à -20°C.

(ii) Étape 2 : PCR en temps réel

Cette seconde étape permet de quantifier en temps réel l'ADNc rétro-transcrit. Le processus est débuté par la synthèse du second brin d'ADNc lors du premier cycle de PCR.

Le Dithiothreitol (DTT), indispensable pour le fonctionnement de la RT (étape 1), est un inhibiteur de la PCR, il faut donc diluer les échantillons avant de les déposer dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus lors de l'étape de mise au point (tableau 1) montrent que parmi les 17 gènes retenus les niveaux d'expression varient ce qui va nécessiter des dilutions différentes des échantillons. Par ailleurs, comme indiqué précédemment une courbe standard de dilutions (de 1/20 à 1/1000) d'ADNc de cerveaux humains est réalisée.

La réaction de PCR se fait dans une plaque de 384 puits qu'il faut préparer dans les conditions « RNAase free » décrites précédemment. Ceci présente l'avantage de pouvoir analyser sur la même plaque mes 80 échantillons (20 LiER ; 20LiER+Li ; 20 LiNR et 20 LiNR+Li) en double (duplicates) et sur 2 gènes à la fois.

Exemple de plan de plaque :

[illegible]

Nous avons réalisé une première série d'expériences avec les 2 gènes de référence (*SDHA* et *HPRT*) et 9 gènes d'intérêt de niveaux d'expression comparables (*CLOCK*, *GSK3 β* , *RORA*, *PER1*, *PER2*, *ARNTL*, *CRY2*, *BHLHE40*, *CSNK1D*). Cependant, une analyse de la variance par ANOVA des résultats a mis en évidence que nos gènes de référence, ne présentaient pas les mêmes niveaux d'expression entre les patients répondeurs (R) et les patients non-répondeurs (N) (voir figure 3) ce qui est en désaccord avec les résultats précédemment obtenu au laboratoire. En effet, 6 gènes de référence avaient été préalablement testés et ces 2 gènes (*SDHA* et *HPRT*) ont été choisis car leur expression était la plus stable dans nos échantillons en présence et en absence de Li dans le milieu de culture.

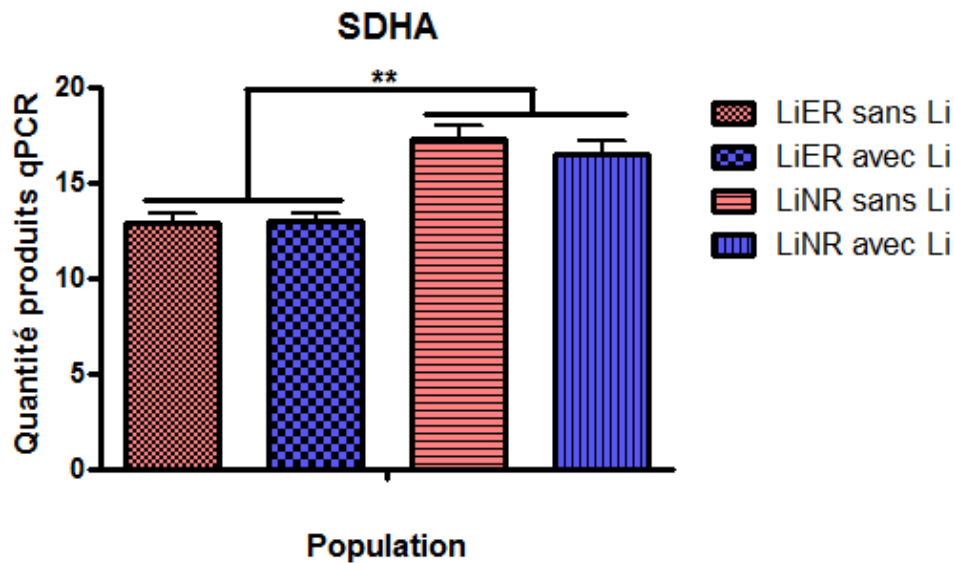


Figure 3 : représentation graphique du niveau d'expression du gène de référence *SDHA* par type de population de réponse au Lithium.

Devant ces différences d'expression observées sur les gènes de référence, nous avons fait un ensemble de contrôles en interne. Nous avons vérifié sur les résultats de PCR obtenus à l'aide du logiciel SDS que cela n'était pas dû à des erreurs de manipulation technique. Nous avons également vérifié que cela ne venait pas de la qualité des ADNc et qu'il n'y avait pas eu de problèmes à l'étape 1 de la RT en réalisant un test de fiabilité du thermocycleur. De plus, une vérification que les amorces des gènes étudiés fonctionnaient correctement a été réalisée. Les seules anomalies détectées survenaient à l'étape de la qPCR réalisée à l'aide du 7900HT™ où une plaque test a mis en évidence des détections non-attendues de fluorescence.

Un contrôle de l'appareil a alors été fait et a mis en évidence à la fois une contamination de l'appareil et un défaut de calibration rendant toutes les expériences réalisées à J4 ininterprétables et nécessitant l'intervention d'un technicien du fabricant.

B. ETUDES EPIGENETIQUES

Partie non débutée.

Cette partie sera réalisée après l'analyse des transcriptomes de J4, J8 et J15.

IV) DIFFICULTES

Les PCRs du mois de janvier ont été compromises par une anomalie de fluorescence sur certains puits suite à une intervention sur le 7900HT™ en décembre où l'appareil avait présenté une première panne. Suite à une contamination et à un défaut de calibration de l'appareil lors de cette intervention les données de fluorescence n'étaient pas fiables. Avant décembre nos résultats (dont les tests d'amorces) étaient interprétables, mais ceux obtenus après cette intervention (PCR des cinétiques de J4) ne le sont pas.

L'appareil a été immobilisé 3 semaines, et le technicien n'est intervenu à nouveau qu'à la mi-février. Le 7900HT™ est à nouveau fonctionnel et les PCR des échantillons J4 vont être répétées.. Ce problème a ralenti l'acquisition des résultats. . Cependant les 2 mois de délai devraient pouvoir être rattrapés dans le courant de l'année 2015.

V) MODIFICATIONS APPORTEES AU PROJET

Quelques modifications ont été apportées au projet lors de sa réalisation :

- Nous avons décidé d'ajouter à notre projet des points de cinétiques plus courtes (à 3 heures, 24 heures et 48 heures). Cela devrait nous permettre d'atteindre un niveau de caractérisation des modifications transcriptionnelles induites par le Li au cours du temps entre les deux groupes.
- Ces 4 mois m'ont permis de mettre en place et de maîtriser tous les outils nécessaires à l'analyse du transcriptome de lignées lymphoblastoïdes.
- Les 2 mois perdus à cause de la panne sur le 7900HT™ ont modifié mon calendrier de projet de thèse d'université comme suit :

	2014	2015				2016			
	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Étude de la signature moléculaire du Li sur les gènes circadiens									
Étude transcriptionnelle (lignées lymphoblastoïdes)									
Étude des miARN ciblant les gènes candidats (lignées lymphoblastoïdes)									
Étude de la méthylation de l'ADN des promoteurs des gènes candidats (ADN Natif)									
Étude de réplication									
Étude transcriptionnelle (ARN du sang circulant)									
Étude des miARN ciblant les gènes candidats (ARN du sang circulant)									
Étude de la méthylation de l'ADN des promoteurs des gènes candidats (ADN Natif)									

VI) PUBLICATIONS

Dans l'attente de la réparation du 7900HT™ de la plateforme de la faculté, nous avons initié un travail de revue de la littérature sur les effets du lithium sur les rythmes circadiens avec un autre doctorant de l'équipe (Jeverson Moreira) : « LITHIUM AND BIPOLAR DISORDER : IMPACTS FROM MOLECULAR TO BEHAVIORAL CIRCADIAN RHYTHMS ». Nous souhaiterions proposer cet article pour publication au journal *Neuroscience and behavioral reviews*.