

**Proposition de sujet de thèse**

**Directeur de Thèse (HDR)**

**Et Co-directeur éventuel**

NB : une codirection doit être spécifiée dès la première inscription en thèse d'université

**NOM** : MENU

Prénom : Patrick

Titre, grade et date d'obtention de l'HDR : Docteur-HDR, Professeur des Universités

**NOM** : DUMAS

Prénom : Dominique

Titre, grade et date d'obtention de l'HDR : Docteur, Ingénieur de Recherche Hors Classe (HDR en cours 2017)

**Unité de Recherche**

**(Nom, nomenclature MESR ou EPST)**

NB : Préciser l'Unité de Recherche ainsi que la sous équipe (définie selon le projet scientifique évalué par l'HCERS)

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA) - Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Biologie-Santé, Faculté de Médecine.

Dir: Pr JOUZEAU Jean-Yves

Équipe 5 de l'UMR 7365 : Ingénierie Cellulaire et tissulaire, Imagerie, Vectorisation (CeTEVI).

Evaluation AERES de l'équipe 5 (15 mars 2012) : A<sup>+</sup> A A / Evaluation globale de l'UMR : A A A<sup>+</sup> A

Proposition de sujet de thèse

**Thèse(s) (soutenues et en cours) encadrées par l'encadrant HDR et  
Thèse(s) (soutenues et en cours) encadrées par le co-  
encadrant depuis 2012**

NB : indiquer Nom des étudiants, dates de début et de soutenance de thèse et publications

Thèses soutenues depuis 2012:

**RAMMAL Hassan** (01/10/2010 → 14/02/14 => 40,5 mois) à salarié sur fonds propres  
" *Différenciation de cellules souches mésenchymateuses en cellules endothéliales : Etude comparative entre les cellules issues de la gelée de Wharton et de la moelle osseuse. Contribution à la construction d'un bio-substitut vasculaire endothélialisé* ". Directeur de thèse : **P. Menu**.

- Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. **H. Rammal**\*, J. Beroud\*, M. Gentils, P. Labrude, **P. Menu**, H. Kerdjoudj, E. Velot. (\*) co-premiers auteurs. *Biomed Mater Eng.* 2013;23(4):299-309.
- Stem cells: a promising source for vascular regenerative medicine. **H. Rammal**, C. Harmouch, J.-J. Lataillade, D. Laurent-Maquin, P. Labrude, **P. Menu**, H. Kerdjoudj. *Stem Cells Dev.* 2014 Dec 15;23(24):2931-49.
- Synergetic Effect of Polyelectrolyte Multilayers and Angiogenic Factors on Differentiation of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Towards Endothelial Cells. **H. Rammal**, C. Harmouch, M. Gentils, F. Boulmedais, P. Schaaf, J.-C. Voegel, C. Gaucher, **P. Menu**, H. Kerdjoudj (manuscrit soumis à *Acta Biomaterialia*).
- Upregulation of endothelial gene markers in Wharton's jelly mesenchymal stem cells cultured on polyelectrolyte multilayers. **Rammal H**, Harmouch C, Maerten C, Gaucher C, Boulmedais F, Schaaf P, Voegel JC, Laurent-Maquin D, **Menu P**, Kerdjoudj H. *J Biomed Mater Res A.* 2017 ; 105(1) : 292-300

**DAN Pan**, (01/10/2012 → 14/02/16 => 40,5 mois) à bourse chinoise (4 ans)  
" *Construction d'un substitut vasculaire colonisé par des cellules progénitrices non immunogènes issues de la gelée de Wharton* ". **Encadré par P. Menu (50%)** et co-encadrée par Véronique Decot (50%).

- a obtenu une bourse d'étude dans le cadre du programme franco-chinois entre Nancy et Wuhan
- MD, chirurgien cardiovasculaire chinois

- The role of mechanical stimuli in vascular differentiation of mesenchymal stem cells. **Dan P.**, Velot E., Decot V., **Menu P.** *J. Cell Science* 2015 ;128(14) : 2415-2422.
- Blood Compatibility of Multilayered Polyelectrolyte Films Containing Immobilized Gold Nanoparticles. Pallotta A, Parent M, Clarot I, Luo M, Borr V, Dan P, Decot V, **Menu P**, Safar S, Joubert O, Leroy P, Boudier A. *Part. Part. Syst. Charact.* 2016 ;1-9.
- Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. Dan P, Velot E, Francius G, **Menu P**, Decot V. *Acta Biomater.* 2017 ; 48 : 227-37.
- Human umbilical cord derived matrix: A scaffold suitable for tissue engineering application. Dan P, Velot V, Mesure B, Groshenry G, Bacharouche J, Decot V, **Menu P.** *BMME 00 (20xx) 1-6 (sous presse)*
- How, by an inside-out method, intraluminal cellularization of vascular scaffolds could be improved?. **Dan P**, Velot E, Tran N, Kearney-Schwartz A, **Dumas D**, Decot V, **Menu P.** (manuscrit soumis 02/2017).

Proposition de sujet de thèse

**BEROUD Jacqueline**, Oct 2011 → Sept 2015 (**maternité**)

à bourse MENRT

" *Différenciation de cellules souches mésenchymateuses sur alginate fonctionnalisées en cellules musculaires lisses en vue de construire un substitut vasculaire cellularisé* ". Encadrée par **P. Menu (50%)** et co-encadrée par É. Velot (50%).

- monitrice en informatique appliquée à la santé à la Faculté de Pharmacie

- Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. Rammal H\*, **Beroud J\***, Gentils M, Labrude P, **Menu P**, Kerdjoudj H, Velot E. \* co-premiers auteurs. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):299-309.
- Brillouin spectroscopy: a new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films. **Beroud J**, Vincent B, Paternotte E, Nguyen VS, Kerdjoudj H, Velot E, Rouxel D, **Menu P**. Biomed Mater Eng. 2013;23(4):251-61.
- Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? El Omar R\*, **Beroud J\***, Stoltz JF, **Menu P**, Velot E, Decot V. \* co-premiers auteurs. Tissue Eng Part B Rev. 2014 Oct;20(5):523-44.
- Valorisation de biomatériaux hybrides par mosaïquage d'images en macroscopie à fluorescence : étude de la colonisation cellulaire de biomatériaux ayant le potentiel de greffons vasculaires. **Beroud J**, Hupont S, Gentils M, **Menu P**, Velot E. Revue Française d'Histotechnologie 2015 Vol28.

**DOSTERT Gabriel**, 01/10/2013 → Juin 2017

à bourse MENRT + ATER

" *Exosomes de cellules souches mésenchymateuses ombilicales : de leur caractérisation à leur utilisation en bio-ingénierie* ". Encadré par **P. Menu (50%)** et co-encadrée par **É. Velot (50%)**

- moniteur en histologie et physiologie à la Faculté de Pharmacie

- Caractérisation physique, morphologique et biologique d'exosomes issus de milieu conditionné. **Dostert G**, Didier R, Arab-Tehrany E, Cleymand F, Louis H, **Menu P**, **Velot E**. Revue Française d'Histotechnologie 2015 Vol28.
- Physical, chemical and *in vitro* characterization of nanoliposomes/chitosan blend scaffolds for tissue engineering. Zhang H\*, Cleymand F\*, **Dostert G**, **Menu P**, Arab-Tehrany E., **Velot E**. \* co-premiers auteurs (manuscrit soumis à Tissue Eng Part A).
- Nanoliposomes of marine lecithin, a new way to deliver TGF- $\beta$ 1. **Dostert G**\*, Kahn CJF\*, Mesure B, **Menu P**, Linder M, **Velot E**, Arab-Tehrany E. \* co-premiers auteurs (manuscrit en préparation).

Dominique Dumas :

Co-direction

**TRAORE Mariama**, (→14/10/08)

à bourse internationale.

" *Mécanisme d'internalisation / récepteur LDL et cellules endothéliales par FRET* ".

Encadrée par S. Muller (50%) et co-encadrée par **D. Dumas (50%)**

**WERKMEISTER Elisabeth** (→14/02/08)

à bourse MENRT.

" *Imagerie multimodale par cartographie 3D en excitation pulsée : de la cellule au tissu* »

Encadrée par JF. Stoltz (50%) et co-encadrée par **D. Dumas (50%)**

Proposition de sujet de thèse

Liste des 5 publications les plus significatives de l'encadrant HDR  
et liste des 5 publications les plus significatives du co-  
encadrant depuis 2012

P. Menu, encadrant :

- Interspecies differences with *in vitro* and *in vivo* models of vascular tissue engineering. Rémy M, Durand M, **Menu P**, Voegel JC, Ponsot JF, Bérard X, Harmand MF, Bordenave L. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(38):9842-52.

Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? EL OMAR R., BEROUJ J., VELOT E., STOLTZ JF., **MENU P.**, DECOT V. *Tissue Engineering, Part B*. 2014; 20(5) : 523-44.

The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells. DAN P. VELOT E., DECOT V., **MENU P.** *J. Cell Science* 2015 ;128(14) : 2415-2422.

Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. DAN P, VELOT E, FRANCIUS G, MENU P, DECOT V. *Acta Biomater*. 2017 ; 48 : 227-37.

Electrospun poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/zinc oxide nanocomposite tissue engineering scaffolds with enhanced cell adhesion and blood vessel formation. AUGUSTINEA R, DAN P, SOSNIKA A, KALARIKKAL N, TRAN N, VINCENT B, THOMAS S, **MENU P**, ROUXEL D. *Nano Research* (sous presse)

D. Dumas : co-encadrant :

Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. BRION A., ZHANG G., DOSSOT M, MOBY V, **DUMAS D**, HUPONT S, PIET M.H, BIANCHI A, MAINARD D, GALOIS L, GILLET P. *Journal of structural biology*. 2015; 192 (3): 500-509.

Évaluation innovante et non invasive de la qualité d'un biomatériau à base de collagène fonctionnalisé par des cellules souches mésenchymateuses humaines avant implantation dans une lésion cartilagineuse. HENRIONNET C, **DUMAS D**, HUPONT S, WERKMEISTER E, HENTSH D, VONESCH J.L, NETTER P, MAGALOU J, STOLTZ J.F, GILLET P, PINZANO A. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*. 2014; 100 (8): e39.

Non-Invasive Second Harmonic Generation (SHG) in Macroscopy (MacroSHG) as Bio-Diagnosis to Image Collagen Network Organization in Extracellular Matrix Engineering. **DUMAS D**, WERKMEISTER E, HUPONT S, HUSELSTEIN C, DE ISLA N, ROUSSEAU M, MENU P, MAINARD D. *Engineering*, 2014;6: 485-490.

Live cell imaging approaches reveal actin cytoskeleton-induced self-association of the actin-bundling protein WLIM1. HOFFMAN C, MOES D, DIETERLE M, NEUMANN K, MOREAU F, TAVARES FURTADO A, **DUMAS D**, STEINMETZ A, THOMAS C. *Journal of Cell Science*. 2014;3453 (127):483-589.

SHG as a new modality for large field of view imaging to monitor tissue collagen network.. **DUMAS D**, HUPONT S, HUSELSTEIN C, DE ISLA N, ROUSSEAU M, WERKMEISTER E, MAGDALOU J, **MENU P.** and J.F. STOLTZ JF. *Biomed Mater Eng*. 2012;1:159-62.

## Proposition de sujet de thèse

### Sujet de thèse proposé

En français

**Titre :** Nouvelle approche quantitative en imagerie vibrationnelle sans marqueurs (MACRO-CARS) capable de qualifier les liaisons chimiques moléculaires au sein d'organisations supramoléculaires d'intérêt en biologie cellulaire et tissulaire.

**Résumé (10 lignes) :**

Spécialisée dans le domaine des pathologies vasculaires et ostéo-articulaires, le laboratoire IMOPA (UMR 7563) a breveté un dispositif biomédical en imagerie biphotonique (MacroMultiphoton) pour sonder des assemblages multi-stratifiés complexes et cellularisés. Un nouvel enjeu incontournable aujourd'hui avant implantation clinique de tels implants vasculaires, nécessite d'étendre ce mode de détection non invasif à la méthode CARS qui sonde la nature même et le nombre des liaisons chimiques caractéristiques des molécules constitutives des assemblages biologiques. Ce projet de recherche vise clairement à développer une méthodologie instrumentale innovante en MACROSCOPIE (non intrusive, multi-échelles), le MACRO-CARS 3D, pour des molécules cibles impliquées (minéralisation, stress oxydant, ...) dans les phénomènes de vieillissement (athérosclérose) et apporter une réelle plus-value méthodologique (localisation et devenir, quantification).

**Mots –clefs (maximum 5) :** Imagerie biophotonique – Optique non linéaire – Raman/CARS – Liaisons chimiques caractéristiques des tissus – vaisseau.

Titre : New quantitative and label-free chemically selective imaging (MACRO-CARS) to probe chemical bonds embedded in supramolecular constructions in cells and tissue.

Specialized in the field of vascular and osteo-articular pathologies, the IMOPA laboratory (UMR 7563) patented a innovative biomedical device in biphotonic imaging (MacroMultiphoton) to probe complex and cellularized multi-layered assemblies. A new challenge today before pre-implantatory diagnosis of such vascular implant, requires to extend this noninvasive detection mode (free label) to the CARS method which probes the nature and the number of the chemical bonds characteristic of the molecules constituting the biological assemblies. The aim of this research project is clearly to develop an innovative instrumentation methodology in macroscopy (non intrusive, multi-scale), MACRO-CARS 3D, for the target molecules involved (mineralization, oxidative stress, ...) in the phenomena of aging (atherosclerosis) and give a real added value methodology (location and becoming, quantification).

**Mots –clefs (maximum 5) :** Multiphoton imaging – Non Linear optical – Raman/CARS – chemical bonds as tissue target – vessel.

Proposition de sujet de thèse

Sujet de thèse proposé

Nom ou Acronyme du projet	MACRO-CARS
Titre	Nouvelle approche quantitative en imagerie vibrationnelle sans marqueurs (Macro-CARS) capable de qualifier les liaisons chimiques moléculaires au sein d'organisations supramoléculaires d'intérêt en biologie cellulaire et tissulaire
Nom et équipe du porteur	MENU Patrick, IMOPA
Cotutelle	OUI/ NON

Contexte de travail et état de l'art : Le Macro-Multiphoton

Pour répondre à la complexité des investigations en biologie, les méthodes modernes d'imagerie utilisent déjà toutes les modalités offertes en spectroscopie de fluorescence (confocal, multiphoton) ; de observation et analyse de structures cellulaires (cytosquelette, noyau, récepteur,...) à l'étude d'interaction moléculaires (FRET), de diffusion (FRAP) jusqu'aux systèmes d'assemblages multi-stratifiés complexes (reconstruction tissulaire, biomatériaux, tissus, petit animal, ...). Au sein de notre laboratoire IMOPA 7365 CNRS, la microscopie de fluorescence reste la technique majeure et la sélectivité biologique (chimique) provient du marquage avec des molécules fluorescentes naturelles ou synthétiques, excitables par absorption à un ou deux photons (multiphotonique). Cependant, ces agents de contraste présentent des limitations majeures pour leur utilisation dans le cas de constructions tissulaires car l'association moléculaire de fluorophores de grande taille (greffage d'anticorps) à des structures cellulaires peut changer la cinétique réactionnelle au niveau de la cascade du signal (internalisation, vésiculation...). De plus, ces stratégies constituent des approches traumatisantes pour les cellules/tissus, comme la perméabilisation membranaire, les transfections cellulaires avec de possibles effets phototoxiques et leur faible photostabilité dans le temps. C'est la raison pour laquelle nous nous orientons vers des **méthodologies sans marquage, les** microscopies multiphotoniques, **qui** connaissent actuellement des développements spectaculaires grâce à l'apport de nouveaux mécanismes de contraste (SHG, THG et CARS) mais aussi d'une meilleure résolution spatiale pour les tissus épais, denses et opaques (vaisseau, cartilage, constructions de bio-tissus...). Dès 2008, le laboratoire IMOPA UMR 7563 (anciennement UMR 7561 CNRS) a initié des travaux en **Microscopie** multiphotonique, avec le travail de thèse de Mlle Elisabeth Werkmeister (« Imagerie Multimodale par cartographie 3D en excitation pulsée : de la cellule au tissu », responsable de thèse : Jean-François Stoltz, co-direction Dominique Dumas). Inscrit dans cette continuité thématique, le laboratoire IMOPA a bénéficié d'un projet à risque CortTech CNRS en 2009 à l'origine d'un prototype original, le Macro-Multiphoton (MMP). Le MMP collecte le signal SHG (Seconde Harmonique Génération) sur des grands champs d'observation, comme des protéines fibreuses (collagène par exemple) qui donnent un signal endogène SHG. Il se présente comme un outil non invasif (pas d'introduction d'agent de contraste comme en imagerie traditionnelle (fluorescence, Pétscan, IRM etc) et non intrusif (sans coupe) dans un environnement le plus proche des conditions physiologiques, sans dénaturer son environnement tissulaire. Après le dépôt d'une lettre Soleau (2010), notre équipe a déposé un brevet (2011/54545) suivi de son extension internationale par le CNRS et l'Université de Lorraine en 2012 (WO 2012/160312 A2).

- Brevet WO 2012160312 A3 (UL/CNRS): Improved biomedical imaging with multiphoton excitation Improved biomedical imaging with multiphoton excitation. (D.Dumas, S. Hupont). - DUMAS D et al, *Osteoarthritis and Cartilage*, Volume 20, S129-S130, 2012. FLAUSSE A., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* Volume 101, Issue 11, pages 3211-3218, November 2013. DUMAS D, et al, *Engineering*, 2014, 6, 485-490. LAURENT C, et al, *Processes* 2014, 2, 167-179. DUMAS D, et al. *Acta Bioq* 2006;7:73-9. WERKMEISTER E, et al, *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37:77-88. DUMAS D, et al, *Biomater Mater Eng* 2010;20:183-8.

## Proposition de sujet de thèse

### Hypothèse de travail et objectifs : le CARS comme méthode non invasive

La microscopie CARS possède l'intérêt fondamental d'être une technique spectroscopique, permettant d'obtenir localement la signature vibrationnelle des molécules ou constituants (lipides, protéines, minéraux, ...) composant l'échantillon, sans marquage ni photoblanchiment, et en théorie d'analyser la composition chimique de n'importe quel point de l'échantillon. Depuis son développement en 1999, le CARS est mis à profit dans le cadre de l'imagerie cellulaire, la caractérisation des protéines, l'imagerie in vivo dans les tissus ( *Evans CL, et al, Annu. Rev. Anal. Chem. 1, 2008*).

La méthode CARS constitue un outil d'investigation indispensable et innovant dans nos thématiques de recherche en biologie cellulaire et tissulaire au sein de l'UMR 7365 CNRS et la FR BMCT 3209. Dans cette continuité méthodologique, nous envisageons de déployer la modalité CARS sur le MacroMultiphoton existant pour réaliser **le premier prototype MacroCARS**. Celui-ci combinerait alors les modalités complémentaires en terme d'échelle biologiques pour préciser : l'organisation *moléculaire* par CARS (liaison chimiques impliquées lors d'activités enzymatiques par exemple), *cellulaire* par fluorescence (câbles d'actine organisé en cytosquelette...) ou *matricielle* par Multiples Harmoniques (réseau de collagènes ou d'autres protéines fibreuses, contenu en lipides orientés, organisation de réseaux de nature chimique).

Du point de vue pratique, la spectroscopie CARS est un développement de physiciens en optique et reste peu accessible aux biologistes car elle conjugue deux limitations majeures pour son utilisation en biologie.

- Seule la modalité en **microscopie** a été développée à destination des biologistes, ce qui rend indispensable son implémentation en **macroscopie**, pour observer des organisations biologiques complexes (tissu, petit animal,...)

- Le seul système commercial disponible à ce jour (SP8-Leica CARS) présente des performances limitées (entre 1205 à 3330  $\text{cm}^{-1}$ ) sans couvrir la gamme qui nous intéresse pour suivre les molécules d'intérêt dans nos travaux (600-1700  $\text{cm}^{-1}$ ). Cette limitation rend indispensable le développement d'une nouvelle méthodologie CARS pour atteindre cette gamme de fréquences inférieure à 1205  $\text{cm}^{-1}$ .

Le CARS nécessite deux faisceaux lasers synchronisés spatialement et temporellement qui sont classiquement apportés à travers un montage optique très onéreux (OPO d'APE par exemple, 200 k€). Nous avons donc envisagé le développement d'un dispositif CARS sur la base d'une autre source d'illumination. Notre laboratoire IMOPA a bénéficié en 2015 d'un projet CNRS DEFI Imag'In pour valider cette faisabilité avec un module femtoWHITE-CARS (Supercontinuum Device for Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, NKT Photonics Danemark), qui est un module renfermant une fibre photonique. En injectant à une longueur d'onde de 800 nm le laser (oscillateur femtoseconde MiraF900 et Verdi 8W, Coherent) déjà implémenté pour le MacroMultiphoton, FemtoWhite-CARS délivre un double faisceau sous un mode « supercontinuum » de deux longueurs d'onde comprise entre 650 et 1050 nm sans dispersion dans l'espace et stable et optimisé pour les applications CARS. En délivrant deux faisceaux parfaitement synchronisés, cette fibre génère un supercontinuum qui pourrait s'affranchir de l'utilisation de systèmes lasers complexes et coûteux dédiés à cette application. Le couplage de ce module supercontinuum sur le MacroMultiphoton disponible nécessite la mise en œuvre d'un banc « cage system » (SCKB-CARS, Thorlabs) et d'autres accessoires optiques spécialisés qui seront réalisés, pour les plus compliquées, à l'aide d'une imprimante 3D. Cette solution CARS présente l'avantage d'être nettement plus abordable (quelques k€) et plus versatile en couvrant une gamme CARS plus large de fréquences (200 à 3350  $\text{cm}^{-1}$ ).

### Perspectives de travail :

Ce projet de **thèse en méthodologie CARS** est original et innovant car il présente une approche interdisciplinaire et permettra de conforter une collaboration entre plusieurs partenaires

## Proposition de sujet de thèse

complémentaires en optique et imagerie (versant vasculaire en particulier), qui utiliseront leurs expertises pour former l'étudiant en thèse sur plusieurs sites : I (IMOPA), II (laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB à Dijon) et III (Institut Langevin de Paris Tech, ESPCI). Le doctorant effectuera des séjours réguliers à l'ICB et l'ESPCI pour participer aux techniques d'implémentation de la fibre Femtowhite ainsi que pour partager et enrichir les connaissances techniques des 2 structures de recherche dans le domaine de l'imagerie CARS.

### **Prévisions année 1 :** *Initier les travaux avec faisabilité sur la Fibre Supercontinuum*

- Valider la compatibilité optique de la Fibre Supercontinuum en mode CARS (puissance supportée, calibration, métrologie)
- Injecter la source laser MIRA F900 dans la fibre Supercontinuum (traitement du signal)
- Implémenter la Fibre Supercontinuum dans le setup du microscope (gestion des réflexions internes...)
- Etablir les conditions optimales en microscopie pour collecter un signal CARS sur des billes références

### **Prévisions année 2 :** *Injection du supercontinuum dans le microscope*

- Mettre en place les dispositifs de métrologie (profil enveloppe faisceau, spectre, puissance)
- Obtenir les premières données d'imagerie CARS en biologie (fibroblaste, ostéoblaste en culture, minéraux, équipes 4 et 5 IMOPA) sur la gamme de fréquence inférieure à 1200 cm<sup>-1</sup>.
- Sélectionner le mode d'injection dans le microscope (voie multiphoton, laser fibré, ...)
- Etablir les conditions optimales en microscopie pour collecter un signal CARS sur des billes références (fréquence, type de détecteur, ...)
- Obtenir les premières données d'imagerie Tissulaire CARS (vaisseau ...) sur la gamme de fréquence inférieure à 1200 cm<sup>-1</sup>.

### **Prévisions année 3 :** *Validation du prototype de Macro-CARS et imagerie*

- Etablir un protocole de pilotage des différents accessoires avec interfaçage logiciel selon les gammes de fréquences et la molécule ciblée.
- Mise en forme des modèles de traitement d'image CARS 3D selon la gamme de fréquence
- Parfaire l'achèvement de la démonstration et des performances du MACRO-CARS sur des spécimens d'intérêt du moment (coupes de vaisseaux, vaisseau entiers et pulpes dentaires).
- MACRO-CARS environné pour des études dynamiques en biologie en atmosphère contrôlé (biominéralisation des embranchements vasculaires, de la pulpe dentaire et petits animaux).
- 

**Perspectives à plus long-terme :** Se rapprocher d'un dispositif d'imagerie (multi-échelles non invasif et universel (200-3200 cm<sup>-1</sup>) et initier les premières étapes de la valorisation économique du dispositif (incubateur lorrain, SATT Grand Est).

### **Faisabilité de la technique et potentialités d'applications en biologie dans l'espace régional:**

Ce projet de thèse vise à ainsi développer un MACRO-CARS en vue de collecter le signal émis (CARS et plus tard SERS) pour des molécules d'intérêt (biominéralisation vasculaire entre autres) présentant des signatures en dessous de 1200 cm<sup>-1</sup>. La double compétence dans le domaine en optique non-linéaire appliquée à l'imagerie tissulaire est reconnue sur la plate forme d'imagerie de la FR3209 BMCT (Dominique Dumas, PTIBC IBISA-Nancy ; <http://www.ptibc-imaging.fr>) qui dispose d'un label national (GIS-IBISA).

La faisabilité théorique de l'efficacité de la source d'illumination non-linéaire avait été validée dans le cadre du précédent projet MMP en collaboration avec l'IGBMC (Strasbourg, Didier Hentsch) et le LBO (Polytechnique, Palaiseau) et le Réseau TRmfM CNRS. Le mode d'injection est connu et précisé dans le brevet déposé par l'équipe 5 d'IMOPA. Même si au niveau pratique, nous avons montré en 2013 que le MacroMultiphoton pouvait recevoir un dispositif Raman (collaboration : ProViSys

## Proposition de sujet de thèse

Engineering et le SI2M- Institut Jean Lamour- CNRS UMR 7198), l'implémentation du CARS reste à démontrée du point de vue méthodologique.

Les images CARS seront traitées d'une part avec des outils de morphologie mathématique, segmentation corrélative en 3D adaptées au signal Raman-CARS (collaboration avec Ganesh D Sockalingum, Université de Reims Champagne-Ardenne, Equipe MÉDIAN, Unité MEDyC, CNRS UMR7369) et d'autre part par l'analyse de texture (méthode statistique du 2nd ordre basée sur la dépendance spatiale et la probabilité de transition entre niveaux de gris de 2 pixels (Matrice de cooccurrence, paramètres de Haralick ou de Markov). Cette méthode a déjà été publiée par notre équipe en 2010 (Thèse E. Werkmeister, co-dirigée par D. Dumas) pour comparer les effets des contraintes mécaniques sur l'orientation des matrices extracellulaires de cartilage humain.

WERKMEISTER E, DE ISLA N, NETTER P, STOLTZ JF, DUMAS D. Collagenous extracellular matrix of cartilage submitted to mechanical forces studied by second harmonic generation microscopy. *Photochem Photobiol* 2010;86:302-10.

De nombreux champs thématiques sont concernés en imagerie MACRO-CARS sans marquage, avec plusieurs projets phares identifiés comme le suivi de la minéralisation (pulpe dentaire et vaisseau, dégradation du cartilage articulaire lors de l'arthrose et du phosphate inorganique par exemple), le suivi de la différenciation de cellules souches, etc. Au sein d'IMOPA, plusieurs chercheurs travaillent sur la différenciation cellulaire de cellules souches en ingénierie cellulaire et tissulaire en lien avec le processus de minéralisation. Ces collaborateurs fourniront les échantillons biologiques pour tester les approches corrélatives (Multiphoton/SHG/CARS) du prototype MACRO-CARS dans le domaine de l'ingénierie des biomatériaux. Le CARS est déjà considéré comme efficace pour étudier et suivre l'apparition des minéralisations ectopiques *in vitro* à partir de culture de cellules primaires (cellules musculaires lisses ou chondrocytes par exemple). Elle a déjà été éprouvée dans ce domaine avec une bonne sensibilité sur la détection de CaCO<sub>3</sub> dans de jeunes huîtres en croissance (H. Rigneault, Equipe Mosaic, Marseille) et la nature des liaisons permettrait de distinguer entre les différents types de structures cristallines comme par exemple le phosphate de calcium (BCP) ou le pyrophosphate de calcium (PPCD).

In fine, ces images multi-modales permettront de suivre la régénération, *in situ* et sans marquage exogène, d'un néo-tissu proche du vaisseau et du cartilage natif mais également de dégradation ou le remodelage des matrices collagéniques natives lors de traitements spécifiques (pathologies dégénératives comme l'athérosclérose ou l'arthrose). De plus, dans le domaine du cancer, une collaboration en Thérapie Photodynamique avec l'ENSIC (Céline Frochot, DR1 CNRS), l'Institut de Cancérologie Lorrain et le CRAN (Walter Blondel PU UL) permettra la caractérisation fine par CARS à l'échelle des liaisons chimiques des interactions moléculaires impliqués dans les processus cliniques en PDT (photosensibilisant de 3<sup>ème</sup> génération).

Ce projet Macro-CARS innovant est parfaitement accessible avec l'ensemble des compétences réunies. Il intéresse par ailleurs fortement la communauté scientifique régionale qui a tout de suite identifié la plus-value importante de cette technologie pour de nombreux projets phares.

Proposition de sujet de thèse

**Intégration à l'UMR; Financements & Environnement:**

**Composition de l'équipe :**

Équipe 5 de l'UMR 7365 : Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Imagerie Vectorisation  
ou « Cell & Tissue Engineering, Vectorization, Imaging » (CeTEVI)

Evaluation AERES de l'équipe 5 (15 mars 2012) : A<sup>+</sup> A A  
Evaluation globale de l'UMR : A A A<sup>+</sup> A

**Responsables :**

Gillet P (PU-PH1) / Menu P (PRCE1)

Grossin L (CR1 CNRS) / Pinzano A (CR1 CNRS), Rousseau M (CR1 CNRS)\*

Bensoussan D (PU-PH2)\* / Loeuille D (PU-PH1), Mainard D (PU-PHCE1, 50%) / Rubio MT (PU-PH2)  
Stoltz JF (PU-PHEM)\* / Wang X (PR1)\* / Aarnink A (PHU) / D'aveni M (CCA) / Decot V (MCU-PH1)\* /

De Isla N (MCF)\* / Huselstein C (MCF)\* / Moby V (MCU-PH1) / Scala-Bertola J (MCU-PH2) / Velot É  
(MCF) / Reppel L (AHU) / Galois L (PU-PH1)\* / Gambier N (MCU-PH1)

Dumas D (IRHC UL) / Henrionnet C (IE1 UL)

Charif N (AI UL) / Helle D G (AI UL) / Cauchois G (TCE UL) / Dussaulx JM (ATRF P2 UL) / Piet MH  
(ADJ P1 UL)

**Doctorants :**

Berte N / Charif N / Dostert G / C. Kichenbrand / Laroye C / Leger A / Liu X / Mesure B / Neybecker P /  
Pape E / Pochon C / Qian C / Targa L / Willemin AS / Yu H / Zhang

En souligné : personnes impliquées dans le projet de recherche.

## **Proposition de sujet de thèse**

### **Thématique du projet de recherche :**

Le projet scientifique de l'équipe 5 CeTEVI appartient à la section 20 (Institut des sciences de l'ingénierie et des systèmes (INSIS)) et à la section 28 du CNRS (Pharmacologie, Bio-ingénierie, Imagerie, Biotechnologie), centré sur 3 principaux axes autour de la Bio-ingénierie, la Vectorisation de biothérapies, et l'imagerie biomédicale multi-échelle.

C'est autour de la thématique de ce dernier axe que s'inscrit ce projet de thèse en imagerie appliquée à des stratégies en biologie cellulaire et tissulaire. L'équipe a déjà développé une imagerie multi-échelle (brevet 2012) destinée à valider certains critères de qualité des biomatériaux ostéocartilagineux et vasculaires par microscopie de seconde harmonique (macro-SHG du réseau collagénique). Nous envisageons maintenant dans ce projet de réaliser un MacroCARS, qui est une imagerie biomédicale multi-échelle sans introduire d'agents de contraste ce qui est indispensable avant toute implantation clinique de tels biomatériaux. Les méthodologies et les setups instrumentaux en optique non-linéaires (multiphoton-cars) réalisées dans le cadre des projets DEFI CNRS (2014-2016) sont ensuite testées sur des modèles tissulaires bien connus au laboratoire (vasculaires et ostéoarticulaires). Ces méthodes d'observation non invasives reposent sur des signatures chimiques des molécules constitutives des substituts biologiques réalisés au sein du Laboratoire IMOPA mais veulent également s'ouvrir à un périmètre beaucoup plus large. L'équipe, qui est numériquement deux fois plus importante que les autres équipes de l'UMR, développe également de nouvelles approches en imagerie pour suivre les biomatériaux implantés chez l'animal par IRM (collaboration avec les services d'imagerie du CHU) en ayant préalablement marqué les progéniteurs par des particules paramagnétiques (SPIOs). Enfin, la collaboration avec la plateforme d'imagerie PTIBC IBISA-NANCY de la FR BMCT 3209 située au rez de chaussée du même bâtiment Biopôle sera très précieuse pour tous les aspects spécialisés du traitement d'images.

### **Financements :**

Au titre d'un appel à projet Défi Imag'IN, Dominique Dumas a bénéficié en 2015 et 2016 de plusieurs soutiens du CNRS pour valider la faisabilité du module FemtoWhite CARS en microscopie CARS (45k€). Une demande de financement 2017-2018 a été déposée en lien le module FemtoWhite CARS et son implémentation sur le MacroMultiphoton (20 k€).

Par ailleurs, la Région Lorraine et l'Université de Lorraine (UL) financent en 2017-2018 un projet porté par Dominique Dumas (collaboration JL Guéant) sur l'« Innovation LORraine en Imagerie BIOMédicale pour l'exploration Macroscopique des modulation des Activités Synaptique liées aux troubles neurologiques associés au vieillissement » (14 k€), en lien avec le MACRO-CARS

De plus, ce projet de thèse bénéficiera des ressources technologiques de la plate forme PTIBC IBISA-Nancy (FR BMCT 3209). Une demande de subventions sera par ailleurs effectuée au titre de la FR BMCT pour la prise en charge des coûts de formation et fonctionnement des appareils impliqués dans le travail de thèse (12 k€ sur 3 ans).

La plateforme PTIBC IBISA-Nancy bénéficie d'un label national IBISA, et son responsable scientifique (Dominique Dumas) a sollicité en février 2017 le GIS-IBISA dans le cadre d'un financement ciblé sur le développement du premier prototype du MACRO-CARS (92k €).

Nous participons à un projet dans un contexte Interrégional (INTERreg 2017, BIGIMBIO) avec pour but l'amélioration en imagerie (CARS\_Raman pour notre partie) de la confrontation des données cliniques dans le traitement de certaines pathologies liées au vieillissement et qui repose sur l'utilisation d'un logiciel dédié et la mise en commun de méthodes analytiques complémentaires (MACRO-CARS, 80 k€).

### **Environnement :**

L'UMR 7365 IMoPA dispose de secteurs suivants : animalerie, histo-cytologie, culture cellulaire, radio-isotopes ; des systèmes de production/purification de protéines ; pour les études transcriptomiques : dispositifs pour effectuer des PCR quantitatives en temps réel avec capillaires et plaques, TLDA, Bio-analyseur.

Les cordons ombilicaux seront obtenus grâce au concours de l'UTCT (**Unité de thérapie cellulaire et banque de tissus, CHU de Nancy-Brabois**) détenteur des autorisations nécessaires pour utiliser des échantillons biologiques humains à des fins de recherche.

**Proposition de sujet de thèse**

En association avec la **FR3209** (BMCT), le groupe ingénierie vasculaire dispose d'une plateforme de cytométrie en flux pour immunophénotyper les cellules, d'une plateforme protéomique (Nano LC, TOF-TOF Autoflex) pour analyser le contenu en protéines des cellules, d'une plateforme IBISA d'imagerie cellulaire (microscopie et macroscopie optique multimodale) pour la localisation de nos protéines d'intérêts. Une plateforme de séquençage haut-débit (Illumina) et une plateforme de Biophysicochimie des interactions moléculaires avec entre autre un robot Técan sont aussi à disposition.

Une collaboration **interdisciplinaire** sera développée entre les biologistes du Laboratoire IMOPA, la plate forme d'Imagerie PTIBC IBISA-Nancy et deux équipes extérieures pour des aspects de méthodologies optiques. L'expertise en biologie cellulaire et tissulaire de l'UMR 7365 IMoPA est complémentaire de l'expertise en imagerie CARS-SRS de l'UMR 6303 dans l'équipe Nanosciences (OSNC) au laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB,) à Dijon (Aymeric Leray, CR) et de l'Institut Langevin de Paris Tech (ESPCI) à l'UMR 7587 CNRS (Kevin Contreras, CR) qui possède de l'expérience sur le développement d'un système d'imagerie avec haute résolution spatiale et en temps réel.

Proposition de sujet de thèse

**FICHE LABORATOIRE**

**Etablissement(s) de rattachement :** Université de Lorraine

**Intitulé du Laboratoire :** UMR 7365 CNRS-UL IMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire)

**Site web :** [www.imopa.cnrs.fr](http://www.imopa.cnrs.fr)

**Coordonnées :** Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Biologie-Santé,

9 Avenue de la forêt de Haye, BP 184,

54505 Vandœuvre-lès-Nancy

**Directeur de laboratoire :** Jean-Yves Jouzeau – **Directeur-adjoint :** Bruno Charpentier

**Institut CNRS de rattachement :** INSIS

**CoNRS :** sections 20 et 28

**Equipes de l'unité :**

- **Equipe 1 :** RNA, RNP : Structure-Fonction-Maturation (resp. C Branlant, B Charpentier & Y Motorine)
- **Equipe 2 :** Ingénierie Moléculaire, Cellulaire, Thérapeutique et GlycosylTransférases (resp. S Fournel-Gigleux & M Ouzzine)
- **Equipe 3 :** Enzymologie Moléculaire et Structurale (resp. K Weissmann & S Boschi-Muller)
- **Equipe 4 :** Inflammation, Dérégulation Phénotypique et Remodelage Articulaire Pathologique (resp. JY Jouzeau & P Reboul)
- **Equipe 5 :** Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Vectorisation, Imagerie ou « Cell & Tissue Engineering, Vectorization, Imaging » (CeTEVI) (resp. P Menu & P Gillet)

**Thèmes de recherche résumés :** Biogenèse des ribosomes et assemblage des particules ribonucléoprotéiques (snoRNPs chez la levure et les vertébrés, snomiRNAs), Transcription des séquences non codantes (épissage alternatif, ARN non codants), Ingénierie des ARNs et des RNPs (modification des résidus, méthodes de criblage), Mécanismes de biosynthèse des glycosaminoglycannes (structure-fonction et régulation des glycosyltransférases par les substrats), Rôle physiopathologique et potentialités thérapeutiques des glycosyltransférases, Enzymologie basée sur l'état d'oxydo-réduction du soufre (peroxyrédoxines, méthionine sulfoxyde réductases, 3-mercaptopyrivate sulfotransférases), Enzymologie moléculaire et structurale des polykétides synthases, Rôle des adipokines dans la physiopathologie de l'arthrose, Dérégulation du phénotype chondrocytaire liée à une minéralisation tissulaire anormale (balance PI/PPi, déficience en MGP), Nouvelles approches anti-inflammatoires des maladies articulaires (galectine-3, PPARgamma), [Ingénierie cellulaire et tissulaire \(cartilage, vaisseaux, différenciation des cellules souches mésenchymateuses\)](#), Vectorisation articulaire (nanoparticules, électroporation), Imagerie multi-échelle (TEP, imagerie de fluorescence, IRM articulaire).

**Mots clés :** Enzymologie, Biologie moléculaire, Biologie structurale, Ingénierie moléculaire, [Ingénierie cellulaire](#), [Ingénierie tissulaire](#), Physiopathologie articulaire, Imagerie articulaire, Vectorisation articulaire.

**Thèmes de recherche détaillés :**

Les thématiques de recherche abordées par les équipes de l'UMR 7365 reposent sur une variété d'expertises permettant de réaliser des études à l'échelon moléculaire, structural, cellulaire, ou intégré. Elles sont complétées par une recherche translationnelle pluridisciplinaire en médecine régénérative, qui s'étend de la recherche de gènes candidats pour des protocoles de thérapie cellulaire à la [conception des biomatériaux de substitution](#) et leur caractérisation par des techniques d'imagerie.

## Proposition de sujet de thèse

Plus spécifiquement, l'équipe 1 étudie la machinerie d'assemblage des particules ribonucléoprotéiques, notamment par des approches structure-fonction, et les mécanismes de maturation des ARNs chez les procaryotes, les archées et les eucaryotes. Ces travaux incluent l'étude des mécanismes d'action d'enzymes modifiant les acides nucléiques et s'étendent aux fonctions des ARN non codants et des complexes ARN-protéines, en situation normale ou pathologique. Elle s'intéresse également aux mécanismes d'épissage alternatif permettant de chercher de nouveaux médicaments à visée anti-infectieuse (anti-VIH) ou de comprendre les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies rares associées à des anomalies d'épissage (dystrophie myotonique, progeria).

L'équipe 2 s'intéresse, par des approches structurales et fonctionnelles, aux mécanismes moléculaires d'assemblage des glycosaminoglycanes (GAGs) *in vitro* et *ex vivo*, avec un intérêt particulier pour la matrice cartilagineuse et la peau ainsi que la régulation épigénétique de leur synthèse dans le contexte particulier du chondrosarcome et, plus largement, du processus métastatique. L'équipe étudie également les mécanismes de régulation des glycosyltransférases en situation normale ou pathologique, et développe des approches expérimentales de type thérapie génique ou invalidation (souris KO) pour caractériser le rôle physiopathologique des Xylosyltransférases (Xyl-T).

L'équipe 3 développe des approches d'enzymologie moléculaire et de biologie structurale pour caractériser des enzymes impliquant la chimie redox du soufre et comprendre les mécanismes catalytiques mis en œuvre dans la lutte contre un stress oxydatif. L'équipe s'intéresse également à la compréhension moléculaire et structurale d'une famille d'enzymes modulaires, les Polykétides Synthèses (PKS), qui produisent des molécules d'intérêt pharmacologique comme des antibiotiques (de type macrolides) ou des immunosuppresseurs (de type rapamycine). L'objectif est de développer, à termes, de nouvelles PKS par ingénierie génétique dans le but de produire de nouvelles molécules originales.

L'équipe 4 associe des approches moléculaires à l'expérimentation animale pour chercher de nouvelles stratégies de contrôle de l'inflammation articulaire (activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , utilisation d'une forme tronquée de galectine-3). L'approche inclut l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés et une stratégie de thérapie génique locale. L'équipe s'intéresse également aux mécanismes moléculaires impliqués dans la modification du phénotype des cellules articulaires (chondrocytes, ostéoblastes sous-chondraux) au cours du processus arthrosique et aux processus de minéralisation pathologique. Cette approche inclut l'étude du rôle physiopathologique de la leptine, adipokine dont les taux circulants et articulaires sont augmentés chez les patients obèses.

L'équipe 5 développe des [stratégies de bio-ingénierie tissulaire par contrôle de la différenciation de cellules progénitrices \(optimisation de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire ou ombilicale, reprogrammation cellulaire\) au sein de biomatériaux pour produire des substituts vasculaires ou articulaires](#). Ces [biomatériaux multicouches « fonctionnalisés »](#) par les progéniteurs sont ensuite [testés dans des modèles animaux](#) de déficits cartilagineux ou [de pontage artériel](#). L'équipe, qui est numériquement deux fois plus importante que les autres équipes de l'UMR, développe également de nouvelles approches de vectorisation articulaire par l'utilisation d'extraits de nacre ou de nanoparticules recouvertes d'acide hyaluronique. Enfin, grâce à la collaboration avec la plateforme d'imagerie PTIBC et avec les services d'imagerie du CHU, l'équipe développe une imagerie multi-échelle destinée à valider les biomatériaux ostéocartilagineux avant implantation par macroscopie de seconde harmonique (macro-SHG du réseau collagénique) et à suivre les biomatériaux implantés chez l'animal par IRM en ayant préalablement marqué les progéniteurs par des particules paramagnétiques (SPIOs).

L'ensemble de ces études repose sur l'emploi d'approches *in vitro* et *in vivo* idoines pour des analyses structure-fonction, ainsi que d'ingénierie des ARN et des protéines en étroite collaboration avec les plateformes de la FR 3209 BMCT « Bioingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique ». Le rôle de ces macromolécules dans plusieurs pathologies, dont les pathologies articulaires, est notamment étudié dans le but d'identifier des biomarqueurs potentiels de sévérité des lésions. De nombreux travaux sont ainsi réalisés à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche clinique.

**Éléments d'expertise et d'évaluation :** Évaluation AERES vague C

UMR: AAA+A

**Proposition de sujet de thèse**

Équipe 1:	AAA
Équipe 2:	AAA
Équipe 3:	AAA
Équipe 4:	AAA
Équipe 5:	AAA <sup>+</sup>

**Effectifs de l'unité en postes budgétaires :**

- Enseignants-chercheurs : 32 (dont 2 émérites)
- Chercheurs EPST : 14 (dont 2 émérites)
- ITA/IATOS : 12 ingénieurs + 5 assistants-ingénieurs + 7 techniciens + 8 adjoints-techniques
- Doctorants, post-doctorants : 36 doctorants + 2 post-doctorants

**Equipements significatifs :**

**UMR 7365 IMoPA :** Animalerie, Q-PCR capillaires et plaques, TLDA, Bio-analyseur, Secteurs de culture cellulaire, d'histologie et d'utilisation des radio-isotopes, Systèmes de production/purification de protéines.

**FR3209 (BMCT) :** Plateforme de protéomique (Nano LC, TOF-TOF Autoflex), Plateforme IBISA d'imagerie cellulaire (microscopie et macroscopie optique multimodale), Plateforme de séquençage haut-débit (Illumina), Plateforme de Biophysicochimie des interactions moléculaires (diffractomètre RX, robots de cristallisation, ITC, dichroïsme circulaire, Résonance plasmonique de surface, robot Técan, spectromètre RMN 600 MHz avec cryosonde).

**Brevets:**

WO 2012/160312 A2 Improved biomedical imaging with multiphoton excitation

[WO 2009/156411 Cellular differentiation process and its use for blood vessel build-up](#)

[WO 2009/010652 Method for proliferation of cells on polyelectrolyte multilayer films and use thereof, particularly for the preparation of cellular biomaterials](#)

WO/2002/074955 A2 Oligonucleotides for regulating the gene coding for TNFalpha and/or genes controlled thereby and use thereof.