

Sous l'égide de la fondation « Recherche et Innovation Thérapeutique en Cancérologie » (RITC) et du Cancéropôle Grand Sud-Ouest

Les cellules souches « cancéreuses » dans leur environnement

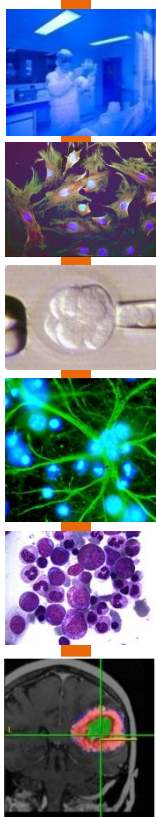
Programme scientifique Résumé des communications Liste des participants

Le 22 juin 2011, Hôtel Mercure Compans Caffarelli, Toulouse



Avec le soutien de

ThermoFisher
SCIENTIFIC



Les cellules souches « cancéreuses » dans leur environnement

>>> mercredi 22 juin 2011 - Toulouse <<<

PROGRAMME	2
SESSIONS PLENIERES - COMMUNICATIONS ORALES	3
Cellules souches de gliomes : développement de nouveaux modèles d'analyse de la niche tumorale - Hervé Chneiweiss.	4
La xénogreffe de cellules souches de leucémie aigue myéloïde humaine révèle leur rareté, leur plasticité phénotypique et leur capacité de résistance thérapeutique - Jean-Emmanuel Sarry.	5
Cellules souches et cibles thérapeutiques dans les leucémies aigues myéloïdes - François Vergez. ..	6
Cell death and forced neuronal differentiation of glioma multipotent cells induced by targeting Nkx2.2 and Ngn2 genes - Jean-Philippe Hugnot.	8
Effet de l'irradiation sur l'invasion des cellules souches de glioblastome - Sylvie Monferran-Sayag.	9
Comparaison de l'expression des gènes de la glycosylation selon le statut de différenciation dans le glioblastome : définition d'une glyco-signature spécifique des cellules souches tumorales - Mathilde Cheray.	10
Ephrine-B1 maintient le destin des cellules souches et contrôle l'intégrité de la niche - Dina Arvanitis.	11
MITF is the key molecular switch between melanoma initiating cells and their differentiated progeny - Robert Ballotti.	12
Isolation de cellules souches cancéreuses par SdFFF - Carole Mélin.	13
Rôle de PXR dans le potentiel de chimiorésistance des cellules souches cancéreuses dans le cancer du côlon - Jean-Marc Pascussi.	14
ATELIERS SCIENTIFIQUES ANIMES PAR THERMO FISHER SCIENTIFIC.	15
L'apport de l'imagerie cellulaire en cancérologie	16
1/ Introduction - Anne Sion.	16
2/ Evaluation of Constitutive DNA Damage Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia using High Content Screening - Christine Didier	16
RNA Interférents : des outils de choix pour la modulation des gènes en cancérologie - Brigitte Pertuiset.	17
Selective enrichment of specific enzyme-classes using active-site probes Kinase Inhibitor Profiling in Neuroblastoma Cells - Carolin Kutzki	17
Innovation dans la gestion des tumorothèques - Isabelle Lestoille	17
Lutte contre les contaminations des cellules - Pierre Dugat	17
LISTE DES PARTICIPANTS	18

PROGRAMME

09h15 Café d'accueil

09h45 Introduction - Cancéropôle GSO, Fondation RITC et Thermo Fisher Scientific

10h00 Session scientifique

Modérateurs : Hélène Bœuf, Gille Favre, Christian Récher

Conférence « Cellules souches de gliomes : développement de nouveaux modèles d'analyse de la niche tumorale » *Hervé Chneiweiss (Inserm U894, Université Paris-Descartes)*

- ✓ La xénogreffe de cellules souches de leucémie aigue myéloïde humaine révèle leur rareté, leur plasticité phénotypique et leur capacité de résistance thérapeutique
Jean-Emmanuel Sarry (Division of Hematology & Oncology, University of Pennsylvania et Inserm U1037, CRCT, Toulouse)
- ✓ Cellules souches et cibles thérapeutiques dans les leucémies aiguës myéloïdes
François Vergez (Laboratoire d'hématologie, CHU Purpan et Inserm U1037, CRCT, Toulouse)
- ✓ Cell death and forced neuronal differentiation of glioma multipotent cells induced by targeting Nkx2.2 and Ngn2 genes - *Jean-Philippe Hugnot (Inserm U1051, INM, Montpellier)*
- ✓ Effet de l'irradiation sur l'invasion des cellules souches de glioblastome
Sylvie Monferran-Sayag (Inserm U911-CRO2, Université d'Aix-Marseille)
- ✓ Comparaison de l'expression des gènes de la glycosylation selon le statut de différenciation dans le glioblastome : définition d'une glyco-signature spécifique des cellules souches tumorales - *Mathilde Cheray (EA3842, Faculté de médecine, Limoges)*
- ✓ Ephrine-B1 maintient le destin des cellules souches et contrôle l'intégrité de la niche
Dina Arvanitis (CNRS UMR5547, CBD, Toulouse)

12h30 Buffet

14h00 Session scientifique

Modérateurs : Frédéric Hollande, Fabrice Lalloué

Conférence « MITF is the key molecular switch between melanoma initiating cells and their differentiated progeny » *Robert Balloti (Inserm U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3M)*

- ✓ Isolation de cellules souches cancéreuses par SdFFF - *Carole Mélin (EA 3842, Faculté de médecine, Limoges)*
- ✓ Rôle de PXR dans le potentiel de chimiorésistance des cellules souches cancéreuses dans le cancer du côlon - *Jean-Marc Pascussi (CNRS 5203, Inserm U661, IGF, Montpellier)*

15h30 Ateliers scientifiques animés par Thermo Fisher Scientific

15h30 L'apport de l'imagerie cellulaire en cancérologie

- Introduction - *Anne Sion, Spécialiste produits (Thermo Scientific)*
- Evaluation of Constitutive DNA Damage Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia using High Content Screening - *Christine Didier (Inserm U1037, CRCT, Toulouse)*

16h00 RNA Interférents : des outils de choix pour la modulation des gènes en cancérologie - *Brigitte Pertuiset, Spécialiste produits (Thermo Scientific)*

16h20 Selective enrichment of specific enzyme-classes using active-site probes Kinase Inhibitor Profiling in Neuroblastoma Cells - *Carolin Kutzki, PhD in Biology - Scientific support manager (Thermo Scientific)*

16h40 Innovation dans la gestion des tumorothèques - *Isabelle Lestoille, Spécialiste produits (Thermo Scientific)*

17h00 Lutte contre les contaminations des cellules - *Pierre Dugat, Directeur des ventes régionales (Fisher Scientific)*

Cancer stem cell plasticity and the multiple niches of high grade gliomas.

Hervé Chneiweiss

Glial Plasticity, Inserm U894, Paris-Descartes University, Center For Psychiatry and Neurosciences, Paris, France.

The majority of adult primitive cerebral tumors and one third of children ones are of glial origin. Models to explain the origin of tumor cellular heterogeneity include a stochastic model in which tumor cells have a random probability of developing mutations to permit tumor maintenance and a hierarchical model in which sustained tumor growth is restricted to selected subpopulations, called cancer stem cells (CSCs). Isolation of CSCs having some of the properties of neural stem cells in medulloblastomas, pediatric gliomas and adult gliomas opens novel insights in the development and therapeutic resistance of primitive brain tumors (Patru et al. BMC 2010, Thirant et al. PLoS One 2011). The CSC hypothesis is consistent with the existence of cellular populations that maintain tumor growth through self-renewal and generation of the larger tumor bulk in cooperation with a supportive microenvironment. Instructive cues to maintain CSCs are generated by both intrinsic networks and the niche microenvironment. The CSC-microenvironment relationship is complex, as CSCs can modify their environment and extrinsic forces induce plasticity in the cellular hierarchy. Recently, leukemia studies suggested that these two models are not mutually exclusive, but rather that tumor cell evolution may involve simultaneous changes governed by both models. Our work showed that conversion of mature astrocytes into functional progenitors induced by a single change in their environment sensitizes them to cancerous transformation (Sharif et al. Oncogene 2007; Dufour et al. Stem Cells 2009). We further found that TICs derived from adult and pediatric gliomas, can be induced to loose and re-gain their stem-like properties in response to serum addition to the culture medium. In collaboration with the group of T. Virolle (Nice), we identified mi-RNA whose expression depends on extracellular signals, and that are involved in the control of these oscillations in the phenotype of TICs (Fareh et al. Cell Death Diff. 2011). In collaboration with J. Gavard (Cochin, Paris) we showed that factors emanating from brain endothelial cells positively controlled the expansion of long-term glioblastoma stem-like cells (Galan-Moya et al. EMBO Rep. 2011). We found that both pharmacological inhibition of and RNA interference with the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduce their growth. Conversely, the endothelial secretome is sufficient to promote this mTOR-dependent survival. Thus, interfering with endothelial signals might present opportunities to identify treatments that selectively target malignant stem-cell niches. This plasticity in the phenotype of CSCs leads us to challenge in gliomas the assumption that CSCs constitute a cell population with stable intrinsic properties, distinct from the other tumor cells present in gliomas. We postulate that within gliomas, cancerous “stemness” is a functional state that can be acquired by many tumor cells under microenvironment-induced epigenetic modifications. Cycles of gain and loss of the stem-like state would hence be the motor of the tumor development and of its therapeutic resistance. We’ll discuss the implications of this model on therapeutic strategies to control cancer evolution.

La xéno greffe de cellules souches de leucémie aigue myéloïde humaine révèle leur rareté, leur plasticité phénotypique et leur capacité de résistance thérapeutique.

Vergez F., Saland E., Murphy K., Secreto A., Swider C., Strzelecki AC., Cavalier C., Demur C., Mansat-De Mas V., Delabesse E., Danet-Desnoyers G., Carroll M., Récher C. & Sarry Jean-Emmanuel.

Division of Hematology & Oncology, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.

Inserm, Centre de Recherche sur le Cancer de Toulouse, U1037, Hôpitaux de Toulouse, CHU Purpan, Toulouse

La résistance thérapeutique est un facteur majeur du mauvais pronostic global des leucémies aigues myéloïdes (LAM). Il est de plus en plus évoqué dans la littérature que cette résistance pourrait résider dans une sous population rare de cellules souches leucémiques (CSL). Ainsi, le développement de nouvelles thérapies ciblant les cellules responsables de la rechute est un besoin urgent et leur éradication pourrait permettre de réduire le risque de rechute. Plusieurs études ont montré que la population de cellules CD34+CD38-, phénotype associé aux cellules souches hématopoïétiques normales, est enrichie en cellules dormantes et CSL, et représente la population la plus résistante à la chimiothérapie in vitro et in vivo dans les LAM. Notre projet est de mieux caractériser ces CSL (en particulier, leur phénotype et leur chimiorésistance) dans un nouveau modèle murin de xéno greffe présentant une sévère immunosuppression (souris NOD/SCID/IL2R γ c-/-, NSG) qui permet non seulement une meilleure prise de greffe de cellules leucémiques mais aussi une meilleure reproduction de la maladie humaine. Nos travaux récemment publiés dans « The Journal of Clinical Investigation » ont confirmé le caractère très minoritaire des CSL au sein du clone leucémique dans ces souris hautement immunodéprimées et leur présence dans la fraction CD34+CD38-. Cependant, contrairement à ce qui avait été précédemment démontré, nous les avons également détectées dans tous les autres phénotypes leucémiques et noté que la grande majorité des CSL n'est pas confiné au phénotype immature CD34+CD38-. Cette hétérogénéité des CSL laisse supposer une très grande plasticité phénotypique des cellules souches leucémiques, comme caractéristique majeure à l'origine de leur résistance et dépendante de la pression de sélection exercée par le microenvironnement tumoral au sein de la niche hématopoïétique, les évènements oncogéniques ou les chimiothérapies. Cette dernière observation confirme la grande difficulté pour cibler sélectivement les CSL et remet en question le développement d'approches thérapeutiques ciblant le compartiment immature ou le phénotype des CSL pour le traitement des LAM, pathologies dans lesquelles peu de progrès ont été accomplis contrairement à d'autres hémopathies malignes. Enfin, parce que ces travaux revisitent le concept de cellules souches cancéreuses, nous développons un nouveau programme d'étude afin de caractériser le rôle du microenvironnement et du métabolisme énergétique dans la résistance aux thérapies in vivo.

Résumé 1 : Activité anti-leucémique du PIK-75, un inhibiteur sélectif de la sous-unité p110alpha de la PI3-Kinase, dans la leucémie aiguë myéloïde.

Vergez F.^{1,4}; Sarry JE.¹; Fialin C.¹; Gallay N.¹; Kruczynski A.²; Guilbaud N.²; Pillon A.²; Chansard N.²; Shepherd P.⁵; Danet-Desnoyers G.⁶; Payraastre B.¹; Demur C.^{1,4}; Manenti S.¹; Récher C.^{1,3}.

1 INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France.

2 Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale, Institut de Recherche Pierre Fabre, Toulouse, France.

3 Service d'hématologie, Hôpital Purpan, CHU de Toulouse, Toulouse, France.

4 Laboratoire d'hématologie, Hôpital Purpan, CHU de Toulouse, Toulouse, France.

5 Maurice Wilkins Center, University of Auckland, Auckland, New-Zealand.

6 Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.

La voie PI3-K/Akt joue un rôle essentiel dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Les sous-unités catalytiques (p110alpha, p110beta et p110delta) de la PI3-K ont été validées comme des cibles prometteuses pour les thérapies anticancéreuses. Le PIK-75 a été décrit comme un inhibiteur sélectif de l'isoforme alpha. Nous avons étudié l'activité du PIK-75 dans 3 lignées cellulaires et 42 échantillons de LAM de patients. Le traitement par PIK-75 a entraîné une diminution de la prolifération des lignées cellulaires (test MTT, IC50: 62 nM, 144 nM, 173 nM dans les lignées KG1, HL60 et KG1a, respectivement). Ceci est dû à l'inhibition de la voie PI3-K/Akt et à l'induction massive d'apoptose. Le PIK-75 inhibe aussi la formation de colonies par les progéniteurs leucémiques (tests clonogéniques, 9 LAM, IC50=72 nM) mais pas par des progéniteurs CD34+ normaux. La sous-population de phénotype CD34+CD38-CD123+ est enrichie en cellules souches leucémiques et résistante à la chimiothérapie conventionnelle. Ces cellules ont une IC50 à l'aracytine cinq fois plus élevée que les blastes mais ne présentent pas de résistance significative au PIK-75 (IC50 de 589 nM et 638 nM, pour les blastes et la sous-population CD34+CD38-CD123+, respectivement). Et l'efficacité du PIK-75 sur les cellules leucémiques n'est pas modifiée à la rechute. Chez des souris NOD/SCID greffée avec HL60, le PIK-75 a induit une diminution significative de la greffe tumorale. D'autres études in vivo sur des souris NSG greffées avec des échantillons primaires de patients sont en cours. Ces résultats démontrent que le PIK-75 est un puissant inhibiteur de la voie PI3-K dans les cellules leucémiques, ce qui pourrait suggérer que la sous-unité p110alpha est une cible essentielle dans les LAM. De plus, le PIK-75 est efficace sur les sous-populations leucémiques chimiorésistantes, ouvrant ainsi la voie à des études cliniques évaluant la combinaison de la chimiothérapie conventionnelle et d'inhibiteurs de la p110alpha.

Résumé 2 : Impact pronostique de la quantité de cellules CD34+CD38-CD123+ au diagnostic dans la leucémie aiguë myéloïde.

Vergez F.^{1,2}; Green AS.³; Sarry JE.¹; Tamburini J.^{3,5}; Gallay N.¹; Ifrah N.⁷; Lacombe C.³; Mayeux P.³; Bouscary D.^{5,7}; Demur C.²; Manenti S.¹; Récher C.^{6,7}; Bardet V.^{3,4}.

1 INSERM, U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France.

2 Service d'Hématologie biologique, CHU Purpan, Toulouse, France.

3 INSERM U1016, Département d'Immuno-Hématologie, Institut Cochin, CHU Cochin, Paris, France.

4 Service d'Hématologie biologique, CHU Cochin, Paris, France.

5 Unité fonctionnelle d'Hématologie clinique, CHU Cochin, Paris, France.

6 Service d'Hématologie clinique, CHU Purpan, Toulouse, France. 7-GOELAMS.

Les cellules de leucémie aiguë myéloïde (LAM) de phénotype CD34+CD38-CD123+ représentent une sous-population enrichie en cellules souches leucémiques. Il a été montré qu'elles étaient plus résistantes aux agents génotoxiques que l'ensemble des blastes leucémiques. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact pronostique du pourcentage de cellules CD34+CD38-CD123+ au moment du diagnostic chez des patients atteints de LAM et traités par chimiothérapie intensive selon les essais thérapeutiques du GOELAMS.

La quantification des sous-populations blastiques a été réalisée par cytométrie en flux chez 111 patients adultes de moins de 66 ans, traités par chimiothérapie intensive pour LAM de novo. Parmi tous les facteurs pronostiques étudiés, le pourcentage de cellules CD34+CD38-CD123+ (>15%) et un caryotype défavorable étaient significativement corrélés avec l'absence de rémission complète (RC). Après régression logistique, le pourcentage de cellules CD34+CD38-CD123+ (>15%) restait significatif pour la RC avec un OR de 0,3 (p=0,02). La duplication interne en tandem de FTL3 était significativement associée à une plus courte survie sans maladie (DFS) chez les 91 patients en RC. Les patients avec <1%, 1-15% et >15% de cellules CD34+CD38-CD123+ avaient une DFS de 57, 11 et 9 mois, respectivement (p<0,0001). L'âge, le pourcentage de cellules CD34+CD38-CD123+, le caryotype, la mutation de NPM1 et FLT3-ITD avaient un impact significatif sur la survie globale (OS). La médiane d'OS était de 78 mois pour les patients avec moins de 1% de cellules CD34+CD38-CD123+ contre 15 mois pour les autres (p<0,0001).

Cette étude souligne l'impact pronostique du pourcentage de cellules CD34+CD38-CD123+ chez les patients atteints de LAM. Ce nouveau facteur peut facilement être introduit dans la pratique clinique bien qu'il nécessite encore une validation prospective sur une large cohorte. En outre, cette sous-population pourrait être une nouvelle cible thérapeutique

Cell death and forced neuronal differentiation of glioma multipotent cells induced by targeting Nkx2.2 and Ngn2 genes.

Guichet PO.¹, Bieche I.², Teigell M.¹, Serguera C.³, Rothhut B.¹, Rigau V.⁴, Scamp F.¹, Ripoll C.¹, Vacher S.², Taviaux S.⁴, Chevassus H.⁴, Duffau H.⁴, Mallet J.⁵, Susini A.², Joubert D.⁶, Colin C.⁷, Figarella-Branger D.⁷, Bauchet L.⁴, Hugnot JP^{1,8*}.

1 INSERM U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St ELOI, 80 av Augustin Fliche 34091 Montpellier Cedex 05, France.

2 INSERM U735, Institut Curie - Hôpital René Huguenin 35 rue Dailly 92210 Saint-Cloud, France.

3 MIRCEN CEA Fontenay-aux-Roses France.

4 CHU Montpellier, Hôpital Guy de Chauliac, Montpellier, France.

5 CRICM, Hôpital Salpêtrière, Paris France.

6 INSERM U661 CNRS UMR5203, IGF, Montpellier France.

7 CRO2 Inserm U911, Faculté de Médecine Timone, 27 Bd Jean Moulin, Marseille France.

8 Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5 France.

Effet de l'irradiation sur l'invasion des cellules souches de glioblastome.

Monferran-Sayag S.¹; Boyrie S.²; Delmas C.²; Lehmann M.¹; Luis J.¹; Toulas C.²; Moyal E.².

1 U911-CRO2/Université Aix Marseille. Equipe « Molécules d'adhérence et invasion tumorale ». 27 boulevard Jean Moulin 13385 Marseille Cedex.

2 U1037-CRCT/Institut Claudius Regaud. Equipe « Radiorésistance tumorale : des voies de signalisation à l'application clinique » 20-24 rue du pont Saint-Pierre 31052 Toulouse Cedex.

La radiothérapie est utilisée dans plus de 50 % des cancers. Néanmoins, des données cliniques et expérimentales montrent que la radiothérapie peut stimuler l'invasion et la métastase. Ces données ont notamment été obtenues pour le glioblastome qui est réfractaire à la chimio-radiothérapie et qui possède une très grande capacité à envahir localement. Les glioblastomes contiennent des cellules souches tumorales (CSG) à l'origine du développement et du maintien tumoral et qui ont été proposées comme étant responsables de la récurrence tumorale des patients. Notre hypothèse de travail est que les CSG pourraient être impliquées dans l'invasion induite par l'irradiation. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé 5 lignées de CSG établies et caractérisées au laboratoire à partir de biopsies de patients. Dans une première partie du travail, nous avons caractérisé les propriétés invasives des CSG vis à vis de leur niche, les vaisseaux tumoraux. Ainsi, nous avons pu montrer que parmi les différents constituants de la lame basale des vaisseaux tumoraux, les lignées de CSG interagissent préférentiellement avec la laminine. La laminine entraîne également la migration des CSG qui se déplacent principalement sous forme mésenchymateuse. Nous avons pu mettre en évidence que les lignées de CSG expriment à leur surface l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$, l'un des récepteurs de la laminine. In vivo, les CSG xénotransplantées en intracrânial chez la souris immunodéficiente forment des tumeurs très invasives dans lesquelles la laminine est exprimée. Dans une deuxième partie de ce projet, nous avons pu mettre en évidence que l'irradiation augmente l'étalement des CSG sur laminine. Pour la poursuite de ce projet, nous compléterons notre étude sur l'impact de l'irradiation sur l'invasion des CSG et déterminerons quels sont les facteurs moléculaires à l'origine de cette invasion radio-induite.

Comparaison de l'expression des gènes de la glycosylation selon le statut de différenciation dans le glioblastome : définition d'une glyco-signature spécifique des cellules souches tumorales.

Cheray M.¹, Petit D.², Forestier L.², Karayan-Tapon L.³, Maftah A.², Jauberteau M.O.¹, Battu S.¹, Gallet P.F.², Lalloué F.¹.

1 EA3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies, Faculté de médecine de Limoges, 87025 Limoges, France.

2 INRA UMR1061 Génétique Moléculaire Animale, Université de Limoges, 87060 Limoges, France

3 INSERM U935, Université de Poitiers, CHU de Poitiers, 86022 Poitiers cedex, France.

Les glioblastomes multiformes (GBM) font partie des tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives. Le caractère invasif et le potentiel à récidiver de ces tumeurs pourraient dépendre de la présence de cellules tumorales radio-résistantes, susceptibles de régénérer la masse tumorale. La caractérisation et l'étude de ces cellules souches cancéreuses (CSC) est donc d'un intérêt majeur afin de mieux établir le degré de malignité tumorale et à terme de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Certains changements post-traductionnels liés au mécanisme de glycosylation pourraient jouer un rôle déterminant dans le maintien des caractéristiques des CSC telles que l'auto-renouvellement, la prolifération et le caractère indifférencié. Afin de comprendre l'implication du mécanisme de glycosylation lors du changement de statut des CSC vers les cellules tumorales différenciées, une analyse transcriptomique différentielle a été menée sur deux lignées cellulaires : U87-MG et U251. Ces dernières ont été cultivées selon deux conditions menant d'une part à des neurosphère-like caractérisée par des cellules indifférenciées, et d'autre part à des cellules adhérentes différenciées. Une analyse comparative des niveaux d'expression de 600 gènes impliqués dans la glycosylation a abouti à la sélection de 8 gènes qui sont spécifiquement surexprimés dans les cellules indifférenciées et dont l'expression protéique a pu être confirmée. Cinq de ces gènes sont également surexprimés dans les cellules indifférenciées issues de cultures primaires obtenues à partir de 3 GBMs isolés de patients. Ces résultats démontrent l'existence d'une glyco-signature spécifique des cellules les plus agressives et les plus indifférenciées proche du phénotype CSC. Cette étude suggère que les gènes impliqués dans la N-glycosylation et les modifications post-traductionnelles pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'inhiber la croissance et le risque de récurrence tumorale.

Ephrine-B1 maintient le destin des cellules souches et contrôle l'intégrité de la niche.

Arvanitis DN, Behar A, Jungas T, Davy A.

Centre de Biologie du Développement UMR 5547 CNRS/Université Paul Sabatier Toulouse III 118 route de Narbonne - Bât. 4R3B2 31062 Toulouse cedex 9, France

Les récepteurs à activité tyrosine kinase Eph et leurs ligands, les éphrines, sont fortement exprimés durant le développement embryonnaire au cours duquel ils jouent un rôle important dans les mécanismes tels que la migration et l'adhérence cellulaire. Outre ces implications, ils peuvent influencer le destin cellulaire, la morphogenèse et l'organogenèse. De plus, la signalisation Eph / éphrine contrôle la physiologie de différents tissus chez l'adulte en conditions homéostatiques aussi bien que dans un contexte pathologique tel que le cancer. Des résultats récents suggèrent que la signalisation Eph/éphrine contrôle la prolifération de nombreux types de cellules souches adultes mais les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette fonction restent encore inconnus. Nous étudions un membre de la famille des éphrines, ephrin-B1 déjà impliqué dans la régulation des propriétés invasives au cours de la tumorigenèse. Nos études montrent qu'éphrine-B1 est exprimée dans les cellules souches neurales et que sa fonction physiologique est de maintenir le destin des cellules souches ainsi que de contrôler l'intégrité de la niche par des interactions complexes impliquant ARF6, intégrine-B1, miR124 et miR-195.

MITF is the key molecular switch between melanoma initiating cells and their differentiated progeny.

Yann Cheli, Sandy Giuliano, Thomas Botton, Stéphane Rocchi, Véronique Hofman, Paul Hofman, Philippe Bahadoran, Corine Bertolotto and Robert Ballotti.

INSERM, U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)
Equipe 1, « Biology and pathologies of melanocytes », Nice, F-06204 Cedex 3, France.

We have identified MITF, the master regulator of melanocyte differentiation, and p27, a CDK inhibitor, as the key molecular switches that control the transition between melanoma-initiating cells and their differentiated progeny. MITF silencing is sufficient to increase the tumorigenic and metastatic potential of B16 melanoma cells. MITF silencing also upregulates the stem cell markers Oct4 and Nanog and induces mesenchymal transition of melanoma cells that might explain their increased invasiveness in vitro and in vivo. Notably, the cell cycle inhibitor p27 is increased in MITF-depleted cells and is required for the induction of the “stemness” and exacerbation of the metastatic properties of melanoma cells. These data were confirmed using human melanoma cell lines. Further, a low-MITF population that has high tumorigenic potential exists spontaneously in melanoma cell lines. Ablation of this population by forskolin-induced differentiation dramatically decreases tumor formation, indicating that eradication of low-MITF cells is an appealing strategy to cure melanoma.

Moreover, we demonstrate that a hypoxic micro-environment decreases MITF expression through an indirect, HIF1 α dependent transcriptional mechanism and increases the tumorigenic and metastatic properties of melanoma cells. Our results reveal a hypoxia-HIF1 α -MITF cascade controlling the phenotypic plasticity in melanoma cells and favouring metastasis development. Targeting this pathway might be helpful in the design of new anti-melanoma therapies.

Isolation de cellules souches cancéreuses par SdFFF.

Carole Mélin¹, Aurélie Perraud^{1,2}, Hussein Akil¹, Marie-Odile Jauberteau¹, Philippe Cardot¹, Muriel Mathonnet^{1,2} and Serge Battu¹.

1 EA3842, Homéostasie Cellulaire et Pathologie, Faculté de médecine de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

2 Service de chirurgie digestive endocrinienne et générale, CHU de LIMOGES, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France.

Premier des cancers digestifs, le Cancer Colorectal (CCR) est la 2ème cause de décès par cancer dans les pays industrialisés. Malgré d'importants progrès thérapeutiques, la survie à 5 ans tous stades confondus reste inférieure à 60%. Le développement du CCR repose sur l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) dont le nombre reste inférieur à 5% parmi l'ensemble de la masse tumorale. Elles sont responsables des échecs thérapeutiques dont la conséquence est la récurrence, l'émergence de clones résistants et la mise en place d'une escalade thérapeutique néfaste pour le patient. La SdFF (Sedimentation Field Flow Fractionation), une technique de fractionnement par couplage flux force, est utilisée comme un outil de tri cellulaire afin d'enrichir, à partir de différentes lignées, en CSC. Après isolation, les populations cellulaires sont caractérisées en fonction de leur état de différenciation. Leur identification repose sur l'expression de marqueurs d'indifférenciation (CD44, EpCAM et CD166) et la perte de l'expression des marqueurs de différenciation cellulaire (la CK20). De plus, les cellules éluées dans la dernière fraction (pour 7 des lignées) et dans la 1ère (pour une autre des lignées) sont capables d'autorenouvellement et de former des colonies. Ces fractions expriment également les marqueurs d'indifférenciation, confirmant leur propriété de CSC. En conclusion, l'ensemble de ce travail permet la mise au point d'un modèle in vitro de CSC, cibles thérapeutiques, sur lesquelles il devient possible d'étudier la sensibilité sélective et les voies d'action des chimiothérapies. Ces résultats seront transposés sur des cultures primaires obtenues à partir de fragments tumoraux, ouvrant la perspective de mise en œuvre d'une thérapie ciblée et adaptée à chaque patient. Cette prise en charge individualisée permettra une diminution des effets secondaires aboutissant à l'amélioration de la réponse thérapeutique, la survie et in fine la qualité de vie des patients.

Rôle de PXR dans le potentiel de chimiorésistance des cellules souches cancéreuses dans le cancer du côlon.

Planque C, Caillo L, Evrard A, Pannequin J, Joubert D, Hollande F, Pascussi JM.

Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) CNRS 5203 - INSERM U661 équipe "Signalisation et Cancer"

UFR MEDECINE Site de NIMES 186, chemin du Carreau de Lanes CS 83021 F-30908 Nimes cedex 2.

Il est maintenant clairement admis que les tumeurs contiennent un faible pourcentage de "cellules initiatrices de tumeur" également appelées "cellules souches cancéreuses" (CSC). Dans le cancer colorectal (CCR), une mutation du gène Apc dans les cellules souches saines de l'intestin serait à l'origine de ces cellules. Ces CSC partagent de nombreuses similitudes avec leurs congénères normales (SC) dont la résistance intrinsèque aux génotoxiques, source de récurrence après chimiothérapies, grâce notamment à l'expression de nombreuses enzymes ou de transporteurs membranaires qui annihilent l'efficacité de nombreux anticancéreux : ABCG2 (efflux du Hoechst, SidePopulation) et l'ALDH1A1 (activité ALDEFLUOR). Nos résultats ont montré que le récepteur nucléaire PXR (NR1I2) augmente la résistance des cellules tumorales coliques à de nombreux cytotoxiques (irinotécan, taxanes, phosphamides, etc). Cette chimiorésistance est principalement le fait d'une augmentation du niveau d'expression de transporteurs (ABCG2, MDR1) et d'enzymes de détoxication (UGT1A1, ALDH1A1) par PXR. D'autre part, des données préliminaires montrent que l'expression de PXR et de ces marqueurs est enrichie dans les modèles de culture privilégiant la survie des CSC (sphéroïdes) et dans les cellules résistantes aux cytotoxiques in vitro. En outre l'inhibition de PXR (siRNA et antagoniste) diminue le nombre de CSC visualisées par l'activité ALDEFLUOR dans plusieurs lignées de CCR. Ces données suggèrent que PXR est un acteur important de la résistance des CSC à la chimiothérapie. La caractérisation du rôle de PXR dans les CSC pourrait permettre d'envisager une nouvelle stratégie visant à empêcher la récurrence tumorale en altérant la capacité des cellules souches à résister aux chimiothérapies.

L'apport de l'imagerie cellulaire en cancérologie

1/ Introduction

Anne Sion, Spécialiste produits, Thermo Scientific

La cytométrie en images est un puissant outil qui associe les avantages de la microscopie à fluorescence et de l'informatique pour visualiser et quantifier diverses cibles cellulaires. Les applications en oncologie sont nombreuses et peuvent s'associer à la caractérisation de marqueurs de pluripotence ou de différenciation de cellules souches.

2/ Evaluation of Constitutive DNA Damage Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia using High Content Screening.

Christine Didier¹, Fanny Grimal², Cécile Demur¹, Jean-Pierre Maquin³, Anne Sion³, Stéphane Manenti¹ and Bernard Ducommun².

1 INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France.

2 Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV), UMS 3039, Toulouse.

3 Thermo Scientific.

La technologie utilisée est l'imagerie cellulaire à haut débit et d'analyse à haut contenu informatif (ArrayScan de Cellomics®). Cette plateforme se compose d'un module Arrayscan, microscope inversé à fluorescence automatisé ; un module de contraste de phase et d'un module pour cellules vivantes, chambre d'incubation contrôlée (température, hygrométrie et taux de CO₂) permettant l'imagerie en temps réel sur des supports de type lames de microscope, plaques 48, 96 et 384 puits ; et enfin, d'une solution informatique permettant le stockage et archivage des images, leur visualisation et analyse on fly ou off line, et l'édition de rapport scientifique.

Les logiciels d'analyse d'images disponibles couvrent de nombreux domaines en biologie et cancérologie. Cette approche permet de mesurer et de localiser des données de fluorescence, d'acquérir des informations morphologiques ou morphométriques et offre l'avantage majeur de pouvoir travailler sur des échantillons peu abondants et des populations très minoritaires (prélèvements de cellules de patients par exemple).

Les applications développées et réalisées grâce à cette technologie d'imagerie cellulaire, nous ont permis par exemple d'étudier l'activation de la voie de signalisation ATM/ATR-CHK1/2-CDC25 au niveau du compartiment souche (CD34+, CD38-, CD123+) de cellules leucémiques de patients atteints de Leucémie Aigüe Myéloïde.

Les équipes potentiellement intéressées par l'utilisation de cette approche d'imagerie cellulaire doivent au préalable faire parvenir leur projet de recherche au responsable scientifique (Christine DIDIER : didier@cict.fr) pour évaluation par le comité d'expertise scientifique.

Cet équipement a été acquis grâce au soutien de la Région Midi-Pyrénées et de l'INCa (PL2008).

RNA Interférents : des outils de choix pour la modulation des gènes en cancérologie.

Brigitte Pertuiset, Spécialiste produits, Thermo Scientific

Après un bref rappel sur l'ARN interférence, nous détaillerons les divers outils disponibles pour révéler la fonction de gènes cibles (siRNA, shRNAmiR), ou celle de microRNA d'intérêt (miRNA « mimics » et inhibiteurs).

Seront abordés :

- Les points critiques de la mise en œuvre de tels outils, comme pour les siRNA, la fonctionnalité, la spécificité et le transfert dans les cellules.
- Le développement de technologies capables d'en améliorer les performances.

Quelques exemples d'application illustreront alors leur intérêt dans le domaine de la cancérologie.

Selective enrichment of specific enzyme-classes using active-site probes Kinase Inhibitor Profiling in Neuroblastoma Cells.

Carolin Kutzki, PhD in Biology, Scientific support manager, Thermo Scientific

Profiling of protein expression can be a powerful tool to gain insight into the pathology of cells and organs. In this study we employed a proteomic approach using ActivX desthiobiotin nucleotide probes to specifically capture and profile the kinome of different Neuroblastoma cell lines. The active site labeling in combination with a MS detection using Tandem Mass Tags (TMT) allowed us to identify differentially expressed protein kinases, to analyze the specificity of certain kinase inhibitors and to profile their targets.

Innovation dans la gestion des tumorothèques.

Isabelle Lestoille, Spécialiste produits, Thermo Scientific

- Le code barre 2D Thermo Scientific permet l'authentification de l'échantillon lors de son déplacement et de son stockage. Le DataMatrix figurant sur chaque tube permet :
 - la collecte
 - le traitement automatique des données.
- Les applications du DataMatrix :
 - traçabilité des échantillons,
 - suivi des tests.

Soit un meilleur stockage en assurant traçabilité et gain de place.

Thermo Fisher Scientific est le leader en terme de cryostockage (tubes, lecteurs, portoirs outils pour déboucher les tubes....)

Lutte contre les contaminations des cellules.

Pierre Dugat, Directeur des ventes régionales, Fisher Scientific

LISTE DES PARTICIPANTS

Nom	Prénom	Profession	Société	Ville	Email
ANNEREAU	Jean-Philippe	Responsable du service de pharmacologie cellulaire et biochimie	Institut de Recherche Pierre Fabre	Toulouse	Jean.philippe.annereau@pierre-fabre.com
ARVANITIS	Constandina	Chercheur	CNRS UMR 5547, CBD	Toulouse	Arvaniti@cict.fr
BALLOTTI	Robert	Responsable d'équipe, DR1	Inserm U895, C3M, Nice, Sophia-Antipolis	Nice	ballotti@unice.fr
BARICAULT	Laurent	Maitre de conférence	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Baricault.laurent@claudiusregaud.fr
BATTU	Serge	Mcu	EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de médecine	Limoges	Serge.battu@unilim.fr
BESSETTE	Barbara	Chargée de recherche contractuelle	EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de médecine	Limoges	Barbara.bessette@unilim.fr
BESSON	Arnaud	Chercheur	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Abesson@cict.fr
BŒUF	Hélène	Directeur de recherche	CNRS UMR 5164, CIRID	Bordeaux	Helene.boeuf@u-bordeaux2.fr
BOIVERT	Carole	Etudiante	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Carole.boivert@wanadoo.fr
BOURIN	Philippe	Médecin	EFS-PM	Toulouse	Philippe.bourin@efs.sante.fr
BOYRIE	Sabrina	Etudiante	Institut Claudius Regaud	Toulouse	Sabrina.boyrie@yahoo.fr
CARBONNEAU	Celine	Ingénieur technico-commercial	Thermo Fisher Scientific	Montpellier	Celine.carbonneau@thermofisher.com
CARRAZ	Maëlle	Chercheur	IRD UMR 152 - Pharmacochimie et Pharmacologie Pour le Développement	Toulouse	maelle.carraz@ird.fr
CASTEILLA	Louis	Pu	Stromalab - CNRS UMR UPS EFS 5273, Inserm U1031	Toulouse	Louis.casteilla@inserm.fr
CAUZAC	Frédérique	Chargée de coordination	Cancéropôle GSO	Toulouse	frederique.cauzac@canceropole-gso.org
CAYREL	Anne	AI	Institut Claudius Regaud	Toulouse	Cayrel.anne@claudiusregaud.fr
CHERAY	Mathilde	Doctorante	EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de médecine	Limoges	Mathilde.cheray@etu.unilim.fr
CHNEIWEISS	Hervé	Responsable d'équipe, DR1	Inserm U894, Paris-Descartes University, Center For Psychiatry and Neurosciences	Paris	herve.chneiweiss@inserm.fr
COUSTETS	Mathilde	Ingénieur d'études	CNRS UMR 5089, IPBS	Toulouse	Mathilde.coustets@ipbs.fr
CREANCIER	Laurent	Chercheur	Institut de Recherche Pierre Fabre	Toulouse	Laurent.creancier@pierre-fabre.com

Nom	Prénom	Profession	Société	Ville	Email
CREMER	Evelyne	Secrétaire Générale	Cancéropôle GSO	Toulouse	evelyne.cremer@canceropole-gso.org
DANIAU	Jean-Louis	Responsable régional consommable sud-ouest	Thermo Fisher	Toulouse	jean-louis.daniau@thermofisher.com
DAVY	Alice	Chercheur	CNRS UMR 5547, CBD	Toulouse	davy@cict.fr
DE TONI-COSTES	Fabienne	Post-Doctorant	Stromalab - CNRS UMR UPS EFS 5273, Inserm U1031	Toulouse	Fabienne.de-toni@hotmail.com
DELMAS	Caroline	Technicienne	Institut Claudius Regaud	Toulouse	Delmas.caroline@claudiusregaud.fr
DELPY	Yannick	Doctorant	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	yannick.delpy@inserm.fr
DIDIER	Christine	Chercheur	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Christine.didier@inserm.fr
DJAVAHERI-MERGNY	Mojgan	Chercheur	Institut Bergonié, Inserm U916, VINCO	Bordeaux	Mojgan.mergny@inserm.fr
DUGAT	Pierre	Directeur des ventes régionales	Fisher Scientific	Toulouse	pierre.dugat@thermofisher.com
ETIEVANT	Chantal	Chercheur	USR3388 CNRS-Institut de Recherche Pierre Fabre	Toulouse	Chantal.etievant@pierre-fabre.com
FARHAT	Andalib	Post-doc	CNRS UMR 5099, LBME	Toulouse	Andalibf@hotmail.com
FAVRE	Gilles	Directeur de la fondation RITC Chef d'équipe	Fondation RITC et Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	favre.gilles@claudiusregaud.fr
FENIER	Nicolas	Post-Doc	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	
FERRAND	Audrey	Chercheur	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Audrey.ferrand@inserm.fr
FOURNIER-NOEL	Clara	Enseignant chercheur	CNRS - UMR 5623 - Laboratoire des IMRCP	Toulouse	Fournier@chimie.ups-tlse.fr
FRANCES	Julie	Ingénieur commercial Fisher Scientific	Thermo Fisher	Toulouse	julie.frances@thermofisher.com
GHODBANE	Abdelhamid	Doctorant	CNRS - UMR 5623 - Laboratoire des IMRCP	Toulouse	Ghodbane@chimie.ups-tlse.fr
GROSS	Fabian	Chef de projet en biothérapies	CIC BT 511, CHU de Toulouse	Toulouse	Gross.f@chu-toulouse.fr
GUICHET	Pierre-Olivier	Doctorant	Inserm U1051, INM	Montpellier	Pierre-olivier.guichet@inserm.fr
GUEGEN-DORBES	Geneviève	Chercheur	Sanofi-Aventis	Toulouse	Genevieve.guegen-dorbes@sanofi-aventis.com

Nom	Prénom	Profession	Société	Ville	Email
GUILBAUD	Nicolas	Directeur du centre de recherche en oncologie expérimentale	Institut de Recherche Pierre Fabre	Toulouse	Nicolas.guilbaud@pierre-fabre.com
HOLLANDE	Frederic	Chef d'équipe	IGF, CNRS UMR 5203, Inserm U661, UM1, UM2	Montpellier	Fhollande@igf.cnrs.fr
HUGNOT	Jean-Philippe	Chercheur	Inserm U1051, INM	Montpellier	Jean-philippe.hugno@univ-montp2.fr
KRUCZINSKI	Anna	Directeur de département pharmacologie	Institut de Recherche Pierre Fabre	Toulouse	Anna.kruczynski@pierre-fabre.com
LACROIX	Aurélie	Post-doctorante	EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de médecine	Limoges	Aurelie.lacroix@unilim.fr
LALLOUE	Fabrice	Mcu	EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de médecine	Limoges	Fabrice.lalloue@unilim.fr
LAPEYRERE	Patrick	Ingénieur commercial	Thermo Fisher	Région Sud	patrick.lapeyriere@thermofisher.com
LARTIGUE-FAUSTIN	Lydia	Post-doctorante	Institut Bergonié, Inserm U916, VINCO	Bordeaux	Lydia.lartigue@free.fr
LAURENT	Victor	Doctorant	CNRS UMR 5089, IPBS	Toulouse	Victor.laurent@ipbs.fr
LAUTIER	Dominique	Directrice adjointe	Fondation RITC	Toulouse	Lautier.dominique@claudiusregaud.fr
LEMARIE	Anthony	Maître de conférences	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Lemarie.anthony@claudiusregaud.fr
LESTOILLE	Isabelle	Spécialiste Produits	Thermo Scientific	Nantes	isabelle.lestoille@thermofisher.com
LUBRANO	Vincent	Neurochirurgien	Inserm U825 et CHU	Toulouse	lubrano.v@chu-toulouse.fr
MAQUIN	Jean-Pierre	Directeur commercial	Thermo Scientific	Le bois en Ré	Jean-pierre.maquin@thermofisher.com
MARENDZIAK	Karine	Chargée de coordination	Cancéropôle GSO	Montpellier	Karine.marendziak@canceropole-gso.org
MARTINEZ-GALA	Judith	AI	Institut Claudius Regaud	Toulouse	Martinezgala.judith@claudiusregaud.fr
MELIN	Carole	Doctorante	EA3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de médecine	Limoges	Carole.melin@etu.unilim.fr

Nom	Prénom	Profession	Société	Ville	Email
MONFERRAN-SAYAG	Sylvie	Mcu	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Sylvie.monferran-sayag@univmed.fr
MORELLO	Dominique	Chercheur	CNRS UMR 5547, CBD	Toulouse	Dominique.morello@gmail.com
ORIO	Julie	Ingénieur d'étude	CNRS UMR 5089, IPBS	Toulouse	Julie.orio@ipbs.fr
PANNEQUIN	Julie	Chercheur	IGF, CNRS UMR 5203, Inserm U661, UM1, UM2	Montpellier	Jpannequin@igf.cnrs.fr
PASCUSSI	Jean-Marc	Chercheur	IGF, CNRS UMR 5203, Inserm U661, UM1, UM2 UFR médecine site de Nîmes	Nîmes	Jean-marc.pascussi@inserm.fr
PERTUISET	Brigitte	Spécialiste Produits	Thermo Scientific	Brebières	Pertuiset@thermofisher.com
PINON	Aline	AI	EA4021 Faculté de Médecine	Limoges	Aline.pinon@unilim.fr
RIOND	Joëlle	Chercheur	USR3388 CNRS-Institut de Recherche Pierre Fabre	Toulouse	Joelle.riond@etac.cnrs.fr
ROTHHUT	Bernard	Chercheur	Inserm U1051, INM	Montpellier	Bernard.rothhut@inserm.fr
SARRY	Jean-Emmanuel	Chercheur	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Jean-emmanuel.sarry@inserm.fr
SAVI	Pierre	Chargé de mission	Fondation RITC	Toulouse	Pierre.savi@fondation-ritc.net
SEVA	Catherine	Dr2 Inserm	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Cathy.seva@inserm.fr
SIMON	Alain	Maitre de Conférences	EA4021 Faculté de Médecine	Limoges	Alain.simon@unilim.fr
SION	Anne	Spécialiste produits	Thermo Scientific	Brebières	anne.sion@thermofisher.com
TAURAND	Marion	Assistant ingénieur	Institut Claudius Regaud	Toulouse	Marion.taurand@hotmail.fr
TOULAS	Christine	Chercheur	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	Toulas.christine@claudiusregaud.fr
VERGEZ	François	Biologiste médical	Inserm/CNRS/UPS UMR1037, CRCT	Toulouse	F.vergez@yahoo.fr
VIEU	Christophe	Professeur des universités	CNRS UPR 8001 LAAS	Toulouse	Cvieu@laas.fr
VILLACRECES	Arnaud	Ingénieur d'étude RF	CNRS UMR 5164, CIRID	Bordeaux	Arnaud.villacreces@u-bordeaux2.fr