



Bilan des activités d'APEX pour l'année 2012

Actions de recherche

Immunopathogénie de l'infection par des Alphavirus (Chikungunya et Ross-River Virus)

Collaboration initiée en novembre 2006 avec Pierre Roques (CEA, Service d'ImmunoVirologie, Fontenay-aux-Roses) et élargie depuis début 2008 à Andreas Suhrbier (Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australie).

En 2005 et 2006, près de 300 000 cas de Chikungunya ont été recensés sur l'Île de la Réunion, 250 patients sont décédés. La réémergence du virus responsable de cette maladie, en Inde et dans les îles de l'Océan Indien, a souligné la nécessité de mieux en comprendre les mécanismes afin de trouver les moyens de la prévenir.

Depuis les résultats obtenus sur la caractérisation de la physiopathogénie du chikungunya sur un modèle d'infection simien (Labadie et al, J Clin Invest, 2010), nous avons développé un modèle murin adulte (Gardner J et al., J Virol, 2010). Ce modèle d'infection a ensuite été reproduit sur des souris KO pour des molécules impliquées dans l'activation des macrophages (CCR2; IRF3&7). L'objectif du suivi immunopathologique et du phénotypage lésionnel est la compréhension à l'échelle moléculaire des mécanismes impliqués dans la physiopathogénie des douleurs articulaires chroniques associées à l'infection par le virus du Chikungunya.

D'autre part nous continuons l'exploration de la physiopathogénie des alphavirus sur le modèle simien en comparant les effets à moyen terme de l'infection par les virus Ross River et Chikungunya.

Publication :

Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Larcher T, Babarit C, Le TT, Anraku I, Kumagai Y, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Khromykh AA, Suhrbier A. Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. *J Virol*, 2012, **86** : 9888-98

Communication :

Dupuis Maguiraga L, Larcher T, Vezmar K, Dereudre-Bosquet N, Babarit C, Delache B, Le Grand R, Roques P. Physiopathologie de l'infection par les alphavirus arthrogéniques: comparaison entre le virus de la rivière Ross et le virus Chikungunya. In: *Journées Francophones de Virologie*, Paris, 29-30 mars 2012

Identification de facteurs de virulence de virus Influenza chez le poulet et le canard

Étude initiée en avril 2007 avec Nadia Naffakh (Institut Pasteur, Génétique moléculaire des virus respiratoires, Paris) et Daniel Marc (Département : Santé animale, Unité : IASP, Nouzilly) dans le cadre d'un PTR INRA-IP et poursuivie à partir de mai 2008 grâce au FRIA. Un financement par l'ICSA a été obtenu pour les années 2011 et 2012.

Les virus de la grippe aviaire sont identifiés comme un problème majeur de santé publique en raison de leur capacité à être transmis épisodiquement à l'Homme sous forme pandémique (pandémie de grippe A en 2009 et risque ressenti de pandémie de grippe H5N1 depuis les premiers cas chez l'Homme en 1997). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de l'acquisition de cette capacité à franchir les barrières d'espèces apparaît nécessaire.

L'analyse lésionnelle et l'étude de la distribution tissulaire du virus chez le canard et la poule permettent de documenter et de comparer la pathogénicité de différentes souches virales mutantes obtenues par génétique inverse par rapport au virus sauvage. L'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes précoces à l'origine du passage des barrières d'espèces.

Publication :

Hoffmann T, Munier S, Larcher T, Soubieux D, Ledevin M, Esnault E, Tourdes A, Croville G, Guérin JL, Quéré P, Volmer R, Naffakh N, Marc D. Length variations in the NA stalk of an H7N1 influenza virus have opposite effects on viral excretion in chickens and ducks. *J Virol*, 2012, **86** : 584-8

Communication :

Hoffmann TW, Munier S, Larcher T, Soubieux D, Esnault E, Tourdes A, Croville G, Guérin JL, Quéré P, Volmer R, Naffakh N, Marc D. La longueur de la tige de la neuraminidase d'un virus influenza aviaire H7N1 produit des effets opposés chez le poulet et le canard. In: *Journées Francophones de Virologie*, Paris, 29-30 mars 2012

Altérations physiopathologiques de poissons zèbres exposés à des polluants environnementaux

Programme ANR ConPhyPop de 3 ans initié en septembre 2009 et coordonné par X. Cousin (IFREMER, L'Houmeau).

De nombreux contaminants d'origine anthropique, émis à des niveaux croissants dans l'environnement, s'accumulent dans les milieux aquatiques où leur impact sous forme de mélanges complexes avec les sédiments est inconnu. L'objectif du programme ConPhyPop est de documenter les conséquences physiologiques de l'exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) en utilisant le poisson zèbre comme espèce modèle.

La contribution d'APEX consiste à identifier les conséquences physiopathologiques à long terme en particulier l'effet cancérogène. Les premiers travaux ont pu mettre en évidence des effets sur les fonctions de l'immunité (augmentation de la sensibilité à certains agents pathogènes), de la reproduction (dégénérescence folliculaire) et sur la cancérogénèse (identification de lésions préneoplasiques et néoplasiques).

Communication :

Cousin X, Daouk T, Péan S, Vignet C, Larcher T, Rounsard F, Lyphout L, Leguay D, Loizeau V, Bégout M. Long term food-exposure to PCB mixtures induces reproductive and behavioural disruptions in Zebrafish. In: SETAC World congress, Berlin, 20-24 mai 2012

Modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis du transgène en thérapie génique

Collaboration avec Oumeya Adjali (UMR 649 INSERM, Nantes).

De plus en plus d'études, sur des modèles animaux et maintenant chez l'homme, décrivent comme immunogène le transfert de gène *in vivo* à l'aide de vecteurs AAV recombinants (AAVr), et ce en particulier lorsqu'ils sont administrés dans le muscle. Les réponses immunes observées, à la fois humorales et cellulaires, peuvent être dirigées contre le transgène ou à l'encontre de la capsid virale, et sont responsables d'une inefficacité du transfert de gène, et parfois même d'une destruction délétère d'origine cytotoxique du tissu transduit.

Nous participons à un projet visant à disséquer les mécanismes mis en jeu lors de la réponse immunitaire vis-à-vis du transgène. La relation entre le vecteur AAV, le site d'injection musculaire et le système immunitaire locorégional est explorée après injection intramusculaire (IM) d'un AAVr de sérotype 8 exprimant l'eGFP chez la souris et le macaque. La contribution d'APEX à cette étude consiste à rechercher la présence de transgène dans le muscle, la rate et les ganglions drainant, à identifier les cellules transduites dans les différents organes et à caractériser les foyers inflammatoires.

Communication :

Gemoux G, Devaux M, Dubreil L, Jaulin N, Guibaud M, Deschamps JY, Larcher T, Guigand L, Dutilleul M, Chereil Y, Moullier P, Adjali O. Macaque immune responses following AAV-based gene transfer to the skeletal muscle: addressing the method of vector delivery. In: ESGCT, Versailles, 25-29 octobre 2012

Épigénétique et expression d'un transgène à partir d'un vecteur AAV après injection intramusculaire chez une souris saine

Collaboration avec P. Moullier et A. Léger (U1089 INSERM, Nantes)

Le transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV recombinants (AAVr) permet une expression stable du transgène *in vivo* après une simple injection intramusculaire d'un vecteur AAVr. L'objectif est d'évaluer l'impact des modifications épigénétiques sur le niveau d'expression d'une protéine thérapeutique après administration intramusculaire (IM) d'un vecteur AAVr.

Deux études ont été mises en place successivement chez la souris saine et chez la souris mdx, modèle de la dystrophie de Duchenne, pour évaluer l'implication de mécanismes épigénétiques sur l'expression de la protéine thérapeutique dans 2 tissus quiescents : le muscle squelettique et le foie après administration IM d'un AAV 2/8-RSV-eGFP. La contribution d'APEX à cette étude consiste à la recherche de transgène dans le muscle, la quantification du transgène exprimé dans le muscle et la caractérisation des foyers inflammatoires associés à l'expression du transgène.

Caractérisation de la population cellulaire infectée par le CAEV dans les tissus de l'appareil génital de la chèvre et du bouc

Collaboration avec l'UPSP RSB ONIRIS et la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de AL-Baath, Hama, Syrie

Ce projet dirigé par Francis Fieni (UPSP RSB Oniris), a pour objectif de caractériser les populations cellulaires infectées par le virus de l'encéphalite arthrite caprine (CAEV) dans les tissus de l'appareil génital de la chèvre et du bouc. Notre contribution à cette étude consiste à participer au choix des anticorps et des sondes fluorescentes, valider les protocoles d'immunomarquages, réaliser les acquisitions en microscopie confocale et les analyser. Nous avons montré que les cellules épithéliales de la corne utérine de chèvre étaient les cellules cibles du CAEV. Nous avons également montré la présence de CAEV dans les testicules de Boucs infectés.

Publications :

Al Ahmad MZA, Dubreil L, Chatagnon G, Khayli Z, Theret M, Martignat L, Chebloune Y, Fieni F. Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with caprine arthritis encephalitis virus (caev) in vivo. *Vet Res.* 2012;43:1-7

Lamara A, Fieni F, Chatagnon G, Larrat M, Dubreil L, Chebloune Y. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013; S0147-9571(13)00016-7

Caractérisation phénotypique des cellules dendritiques, stimulées par un agoniste de la voie $\beta 2$ -adrénergique

Collaboration avec J. Hervé et P. Blancou (UMR 707 IECM ONIRIS)

L'objectif est de déterminer les effets *in vitro* et *in vivo* de la stimulation $\beta 2$ -adrénergique sur la *cross* présentation des antigènes par les cellules dendritiques. Dans ce projet, nous apportons notre expertise en microscopie confocale et en analyse morphométrique pour phénotyper les cellules dendritiques avant et après stimulation. Nous avons localisé et quantifié NF κ B ainsi qu'un peptide spécifique du complexe CMH sur les cellules dendritiques avant et après stimulation, avec du salbutamol, agoniste $\beta 2$ -adrénergique.

Publication :

Hervé J, Dubreil L, Tardif V, Terme M, Pogu S, Aneon I, Rozec B, Gauthier C, Bach J, Blancou P. B2-adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2013;180:3163-3171

Actions de soutien et de formation

Soutien méthodologique en histomorphométrie

Validation d'un modèle murin d'allergie alimentaire et évaluation de l'efficacité de la désensibilisation épicutanée

Étude initiée en mai 2009 avec DBV technologies (Hôpital Cochin, Paris).

Les résultats obtenus sur le modèle murin de sensibilisation alimentaire, ont justifié le recours à un modèle de grande taille, le porc. L'analyse lésionnelle des portions du tube digestif ayant été soumises à un régime alimentaire à base d'arachide, a permis d'identifier un modèle original d'allergie alimentaire. L'efficacité d'un traitement de désensibilisation épicutanée est en cours d'évaluation .

Publication :

Mondoulet L, Dioszeghy V, Larcher T, Ligouis M, Dheft V, Puteaux E, Cherel Y, Letourneur F, Dupont C, Benhamou PH. Epicutaneous Immunotherapy (EPIT) Blocks the Allergic Esophago-Gastro-Enteropathy Induced by Sustained Oral Exposure to Peanuts in Sensitized Mice. *PLoS One*, 2012, 7 : e31967

Communication :

Mondoulet L, Dioszeghy V, Dheft V, Ligouis M, Puteaux E, Larcher T, Cherel Y, Dupont C, Benhamou PH: Efficacy of epicutaneous immunotherapy (EPIT) in a new model of peanut-induced eosinophilic esophagitis (EoE) and allergic enteropathy (AE). In: Food Allergy and Anaphylaxis Meeting, Venice, 17-19 février 2011

Influence de produits de la réaction de Maillard sur le développement post-natal chez le porcelet

Étude initiée en 2011 avec Latifa Najjar (Institut LaSalle, Beauvais).

Pour cette étude, nous avons repris la méthodologie développée les années précédentes pour quantifier le degré de maturation des principaux tissus du nouveau-né.

Publication :

Houry D, Larcher T, Leridon-Niquet C, Boukthir M, Chango A, Tessier FJ, Abdennebi-Najar L. Effects of formula milk AGEs on the IUGR piglets kidneys. In: *International Symposium on the Maillard Reaction*, Nancy, 16-20 septembre 2012

Soutien en phénotypage tissulaire et cellulaire

Colocalisation miRNA et marqueur endosomal en microscopie confocale

Collaboration avec l'UMR 707 IECM ONIRIS, Nantes

Il est supposé que la stimulation de réponses immunitaires par certaines séquences miRNAs résulte de l'interaction directe du miRNA avec des récepteurs de type Toll-like receptor (TLR) au niveau du compartiment endosomal. L'objectif de l'étude est de mettre en évidence une colocalisation du miRNA-29b avec un marqueur du compartiment endosomal dans les cellules murines RAW. Dans ce projet, nous apportons notre expertise en immunocytochimie et en sonde fluorescente. Nous réalisons les acquisitions en microscopie confocale.

Exploration d'un marquage différentiel des cellules de l'Embryon de Bovin en microscopie confocale

Collaboration **SSBR** ?? Oniris, Nantes

Marie-Anne COLLE 3/6/13 21:32

Mis en forme: Surlignage

L'objectif de l'étude de marquer de façon différentielle des cellules de la masse interne et du trophoblaste sur des embryons de bovins produits *in vitro* et de compter les cellules dans le but de valider un milieu synthétique de culture des embryons de bovins mis au point par l'unité SSBR. Notre contribution à cette étude consiste à participer au choix des sondes fluorescentes, des conditions de préparations et de montage des échantillons, de réaliser les acquisitions en microscopie confocale et de proposer une méthode de quantification.

Identification d'amibes dans un modèle chirurgical d'infestation d'anses isolées chez le porc

Étude réalisée avec François Meurens (Dpt : SA, Unité : ISP, Nouzilly) et Fabienne Misguich (Institut Pasteur, Paris).

Le rôle d'APEX est d'apporter son expertise pour valider d'une part le modèle chirurgical en évaluant les modifications histologiques consécutives à la modélisation, et pour identifier d'autre part les éléments parasitaires au sein d'un tissu lésionnel sévèrement remanié à l'aide de différentes techniques histologiques et immunohistochimiques.

Publication :

Girard-Misguich F, Delgado M, Berthon P, Rossignol C, Larcher T, Bruel T, Guibon R, Guillén N, Meurens F. Porcine colon explants in the study of innate immune response to *Entamoeba histolytica*. *Vet Immunol Immunop*, 2012, **145** : 611-7

Validation d'un modèle d'infection par le virus de la maladie de Marek d'explants cutanés de poules

Étude initiée cette année avec Caroline Denesvre (Dpt : SA, Unité : ISP, Nouzilly).

APEX évalue l'impact de la culture sur la structure histologique des explants cutanés et en particulier sur l'organisation des follicules plumeux à l'aide de techniques d'histologie et d'immunohistochimie. Le premier objectif est de valider ce modèle expérimental afin de l'utiliser pour étudier les phases de réplication virale du virus.

Formations

Séminaire sur les nouvelles approches en microscopie de fluorescence pour la SFR Bonamy (jours ????) Décembre 2012, Nantes)

Organisation d'une formation en microscopie confocale avec la plateforme MicroPicell (4 jours en Juin 2012).

Marie-Anne COLLE 3/6/13 21:48

Mis en forme: Surlignage

Études toxico-pathologiques réglementaires et expertises diagnostiques

Évaluation toxicopathologique

Prestations pour des partenaires académique et privé (Genethon, Evry ; LeoPharma, Ballerup, Danemark) afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de produits thérapeutique sur des espèces animales comme la Souris ou le Macaque avant de proposer ces produits pour des applications cliniques chez l'Homme.

Publication :

Cozzi SJ, Ogbourne S, James C, Rebel H, de Grujij F, Ferguson B, Gardner J, Le TT, Larcher T, Suhrbier A. Ingenol mebutate field-directed treatment of UVB-damaged skin reduces lesion formation and removes mutant p53 patches. *J Invest Dermatol*, 2012, 132 : 1263-71

Communication :

Servais L, Le Guiner C, Montus M, Garcia L, Fromes Y, Hogrel J-Y, Carlier P, Cherel Y, Moullier P, Voit T. *Saut d'exon par AAV8/U7 dans la dystrophie musculaire de Duchenne : De la souris à l'homme en passant par le chien*. Communication présentée à XXIIème congrès de la SFNP, Marseille, France, 30 janvier-2 février 2012

Ontogénèse

Prestation pour M. Castex (Lallemand Animal Nutrition, Blagnac) et l'équipe de J. Gatesoupe (NuMeA, INRA, Saint-Pee sur Nivelles) visant à évaluer l'impact d'une formulation alimentaire sur le développement de larves de bar.

Communication :

Gatesoupe JJ, Lamari F, Mazurais D, Larcher T, Castex M, Bakhrouf A. The effects of dietary addition of two lactic acid bacteria on the development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*. In: *Aqua*, Prague, 1-5 septembre 2012

Diagnostic nécropsique et histopathologique

Identification des causes de mortalité accidentelle observée chez des chiens d'expérimentation hébergés au centre de thérapie génique de Boisbonne (Ecole vétérinaire, Nantes) et des poissons zèbres (VIM, INRA de Jouy en Josas) afin de mettre en place les mesures correctives nécessaires à la prévention de ces événements.

Actions de développement

Politique qualité

Nos exigences concernant la fiabilité et la traçabilité de nos résultats de recherche font l'objet d'un souci constant. Ce niveau d'exigence a pour but de satisfaire nos partenaires dans le cadre de nos collaborations scientifiques et de fournir des résultats exploitables et reconnus par les instances réglementaires du médicament dans le cadre des études toxicopathologiques. Ces exigences sont matérialisées par notre démarche qualité mise en place depuis plus de 5 ans suivant le référentiel INRA.

- L'équipe APEX -