



## Bilan des activités d'APEX pour l'année 2011

### Collaborations scientifiques

#### **Caractérisation d'un modèle animal d'infection par le virus Chikungunya**

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 complément de notre participation à l'étude de la physiopathogénie de la maladie à partir d'un modèle d'infection simien (Labadie et al, J Clin Invest, 2010), nous avons développé parallèlement un modèle murin adulte afin d'une part de disposer d'un modèle présentant une symptomatologie plus sévère que le macaque (Gardner J et al., J Virol, 2010) et de pousser la caractérisation de la physiopathogénie de la maladie en ayant recours à des modèles knock out en particulier. 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 aux infections par des Alphavirus. Ces arthrites chroniques à induction virale pourraient également constituer un modèle expérimental de certaines formes d'arthrite rhumatoïde. Ces travaux ont ainsi montré que les inhibiteurs de la voie d'activation passant par CCR2, pourtant pressentis pour le traitement des arthrites rhumatoïdes, exacerbaient la réplication virale et l'inflammation associée (Rudd PA et al, soumis).

Publication :

Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Le TT, Anraku I, Larcher T, Babarit C, Kumagai Y, Akira S, Khromykh A, Suhrbier A: IRF7 and IRF3 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. *EMBO Mol Med* [soumis]

Communication :

Roques P, Gras G, Labadie K, Larcher T, Cherel Y, Suhrbier A, Le Grand R: Chikungunya virus infection involved monocytes and during chronic phase of the disease persisted in tissue macrophages. *Eur. J. Clin. Invest.* 2011, **41**: 40-40

#### **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.

L'analyse lésionnelle et l'étude de la distribution tissulaire du virus 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*, 2011 [Epub ahead of print]

Esnault E, Bonsergent C, Larcher T, Bed'hom B, Vautherot JF, Delaleu B, Guigand L, Soubieux D, Marc D, Quéré P : A novel chicken lung epithelial cell line: Characterization and response to low pathogenicity avian influenza virus. *Virus Res*, 2011, **159** : 32-42

#### **Altérations physiopathologiques de poissons zèbres exposés à des polluants environnementaux**

Programme ConPhyPop de 3 ans initié en septembre 2009 et financé par l'ANR (portant sur les Hydrocarbures Poly-Aromatiques). Les collaborations initiées par ce programme ont permis l'intégration à d'autres projets d'écotoxicologie en particulier GénérationPop (portant sur les PolyChloroBiphenol).

La contribution d'APEX consiste à identifier les conséquences physiopathologiques à long terme sur le poisson zèbre utilisé comme espèce modèle après une exposition à des contaminants d'origine anthropique. 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 pré-néoplasiques et néoplasiques).

Publication :

Daouk T, Larcher T, Rouspard F, Lyphout L, Rigaud C, Ledevin M, Loizeau V, Cousin X : Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situation induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquat Toxicol*, 2011, **105** : 270-8

## **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 le transfert de gène *in vivo* à l'aide de vecteurs AAV recombinants (AAVr) comme étant immunogène, 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 du tissu transduit.

Nous participons à un programme visant à disséquer les différents mécanismes mis en jeu lors de la réponse immune précoce 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 d'un AAVr exprimant l'eGFP chez la souris et le macaque. La contribution d'APEX à cette étude consiste à rechercher par immunohistochimie et hybridation *in situ* la présence de transgène dans le muscle, la rate et les ganglions drainants et d'identifier les cellules transduites dans les différents organes.

Communication :

Gernoux G, Guilbaud M, Dubreil L, Planel P, Larcher T, Le Guiner C, Cherel Y, Moullier P, Adjali O : Intramuscular AAV8 delivery in mice results in intricate vector interactions with the host immune system and dendritic cell transduction. *In* : 10th Annual Congress of the French Society of Cell and Gene Therapy, Nantes, 6-8 juin 2011

## **Etude de la réponse immunitaire de chevreux créoles contre Haemonchus contortus**

*Étude initiée en mars 2009 avec Jean-Christophe Bambou (Dpt : SA, URE, Petit Bourg, Guadeloupe). Une demande ANR jeune équipe dans laquelle APEX est partenaire est en cours de constitution afin de prolonger cette étude.*

L'objectif est de caractériser la réponse de l'hôte suite à une infestation par voie orale, selon le statut génétique résistant ou sensible de l'animal afin d'identifier des facteurs de résistance aux nématodes digestifs. APEX analyse les lésions de la caillette et caractérise les infiltrats cellulaires inflammatoires et vient compléter les données récoltées *in vivo*.

## **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).*

L'analyse lésionnelle de différentes portions du tube digestif de souris, ayant été soumises à un régime alimentaire à base d'arachide, a permis d'identifier un modèle original d'allergie alimentaire. Un traitement de désensibilisation épicutanée est en cours d'évaluation chez le porc devant les résultats encourageant obtenus chez la souris.

Publication :

Mondoulet L, Dioszeghy V, Larcher T, Ligouis M, Dhelft V, Puteaux E, Cherel Y, Letourneur F, Dupont C, Benhamou P : Epicutaneous immunotherapy (EPIT) blocks the allergic esophago-gastro-enteropathy induced by sustained oral exposure to peanuts in sensitized mice. *J Allergy Clin Immunol* [soumis]

Communication :

Mondoulet L, Dioszeghy V, Dhelft 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 la leptine sur le développement post-natal chez le porcelet**

*Étude initiée en 2008 avec Latifa Najar (UMR1197, INRA, Jouy-en-Josas/Institut LaSalle, Beauvais).*

Pour cette étude, nous avons développé et validé des outils pour quantifier le degré de maturation des principaux tissus du nouveau-né afin de pouvoir comparer les effets de certains régimes alimentaires supplémentés sur le traitement des retards de croissance et des insuffisances fonctionnelles associées chez les prématurés. L'ensemble de ces résultats montre l'effet bénéfique de la leptine.

Publication :

Attig L, Larcher T, Gertler A, Abdennebi-Najar L, Djiane J : Postnatal leptin is necessary for maturation of numerous organs in newborn rats. *Organogenesis*, 2011, 7 : 88-94

## Soutien en phénotypage tissulaire et cellulaire

### *Phénotypage des cellules dendritiques stimulées par un agoniste de la voie $\beta$ 2-adrénergique.*

*Collaboration avec Julie Hervé et Philippe Blancou (UMR 707 IECM INRA/ONIRIS, Nantes)*

L'objectif est de déterminer les effets *in vitro* et *in vivo* de la stimulation avec du salbutamol, un agoniste  $\beta$ 2-adrénergique sur la cross-présentation des antigènes par les cellules dendritiques. Dans cette étude, nous apportons notre expertise en microscopie confocale et en quantification du signal fluorescent pour phénotyper les cellules dendritiques avant et après stimulation. Nous avons ainsi déterminé les variations de localisation et de niveau d'expression de NF $\kappa$ B et d'un peptide spécifique du CMH sur les cellules dendritiques avant et après stimulation.

Publication :

Hervé J, **Dubreil L**, Tardif V, Terme M, Pogu S, Anegon I, Rozec B, Gauthier C, Blancou P. B2-adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross presentation by dendritic cells. *PNAS* [soumis]

### *Epigénétique et expression d'un transgène à partir d'un vecteur AAV après injection intramusculaire chez une souris saine.*

*Collaboration avec Philippe Moullier (UMR649 INSERM)*

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 d'un vecteur AAVr. Une première étude a été mise en place chez la souris pour laquelle nous réalisons l'évaluation par immunohistochimie du niveau d'expression du transgène.

### *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 Misguish (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, Cognie J, Delgado M, Berthon P, Rosignol C, **Larcher T**, Melo S, Bruel T, Guibon R, Chérel Y, Sarradin P, Salmon H, Guillén N, Meurens F. Towards the establishment of a porcine model to study human amebiasis. *PLoS One* [in press]

### *Typage des cellules infectées par le virus de l'encéphalite-arthrite caprine (CAEV) dans les tissus génitaux de la chèvre et du bouc*

*Étude réalisée avec Francis Fieni (UPSP RSB Oniris) et la Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de AL-Baath, Hama, Syrie*

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 ainsi 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.

Publication :

Ali Al Ahmad MZ, **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*, 2011 [in press]

### *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 différentes techniques d'histologie et d'immunohistochimie. Le premier objectif est de valider ce modèle expérimental dans un premier temps avant de l'utiliser pour étudier les phases de réplication virale du virus.

---

## Études toxico-pathologiques réglementaires et expertises diagnostiques

---

### **Évaluation toxicopathologique**

Prestations pour des partenaires académiques (PFIE, Nouzilly) et privés (Endotis Pharma, Romainville ; LeoPharma, Ballerup, Danemark) afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de molécules à visée thérapeutique chez des espèces animales de laboratoire (souris, rat, porc et chien).

Publication :

Cozzi SJ, Ogbourne S, James C, Rebel H, de Gruijl 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*, 2011 [in press]

### **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) afin de mettre en place les mesures correctives nécessaires à la prévention de ces événements. Une dizaine d'autopsies a été pratiquée cette année dans ce cadre.

---

## Actions de développement

---

### **Développement des techniques de biologie moléculaire sur lame**

Nos travaux de développement de la technique d'hybridation *in situ* (HIS) sont actuellement concentrés sur la détection et l'identification de *subspecies* de mycobactéries au sein de tissu intestinal. Ce travail initié à la demande de Patricia Berthon (ISP, Nouzilly) prolonge les travaux antérieurs d'optimisation de la sensibilité et de la spécificité de la technique.

### **Mise en place d'une démarche 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 toxipathologiques. Ces exigences sont matérialisées par notre démarche qualité mise en place depuis plus de 5 ans suivant le référentiel INRA.

- L'équipe APEX -