



HAL
open science

De l'immunologie fondamentale à l'immunologie appliquée dans le contexte "One Health", une seule santé.

Delphine Le Roux

► To cite this version:

Delphine Le Roux. De l'immunologie fondamentale à l'immunologie appliquée dans le contexte "One Health", une seule santé.. Immunologie. Université Paris-Est Créteil, 2023. tel-04537714

HAL Id: tel-04537714

<https://hal.science/tel-04537714>

Submitted on 22 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DE L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

De l'immunologie fondamentale à l'immunologie
appliquée dans le contexte
« One Health », une seule santé



2022
Université Paris-Est Créteil

Par
Delphine Le Roux
Maître de Conférences en Immunologie à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Jury composé de :
Pr Marie-Laure Dardé, rapporteur
Dr Fabrice Laurent, rapporteur
Dr Emmanuel Donnadieu, rapporteur
Dr Hélène Yera, examinateur
Dr Jennifer Richardson, examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de le composer pour évaluer ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance au Pr Marie-Laure Dardé, aux Dr Fabrice Laurent et Dr Emmanuel Donnadiou d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'au Dr Héléne Yera et au Dr Jennifer Richardson d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je remercie également énormément tous les membres de l'UMR BIPAR pour m'avoir accueillie depuis 2012 parmi eux, mais ils sont trop nombreux pour les citer tous ! Merci aussi à Sara Moutailler, Directrice de l'UMR et Grégory Karadjian, adjoint à la Directrice, pour leur soutien et le trinome qu'on forme. Je remercie tout particulièrement les membres du groupe « Toxoplasma » et surtout le Pr Radu Blaga qui m'accompagne depuis le début de cette aventure, Amandine et Sandra.

Je tiens également à remercier l'équipe du secteur bactériologie/immunologie du BioPôle : Christelle, Corinne B, Didier et bien sur Henri-Jean pour le café de 10h, la bonne humeur et les records en tout genre à fêter ! Je remercie particulièrement Cathy qui me manque, et aussi mes collègues du DSBP, que j'ai plaisir à retrouver à chaque conseil de département, avec une mention spéciale pour Corinne W !

Je ne remercie pas le Canto2 et surtout son HTS...

Je remercie aussi tous les étudiants que j'ai pu former à la paillasse et ceux qui ont travaillé à mes côtés et qui maintenant ont des carrières dont je suis admirative, bravo les ptits piou-pious !!

Je remercie du fond du cœur mes amies de toujours : Ma Poulette Odile, Vivi, Stef et Sophie, et vos familles aussi ! Merci pour votre écoute, votre soutien et pour nos soirées « filles » qu'on continue malgré nos emplois du temps de maman-ministres !!

Je remercie profondément mes amies de Cochin : Florence, Maryline, Anne-Sophie et les « Niederganguettes » Floriane, Elodie, Julie et Audrey.

Go raibh míle maith agait mo ghrá, póga. Je l'avais écrit en 2006, je le redis, je l'écris toujours et encore plus fort en 2023. Merci à notre magnifique famille que j'aime ♥

Merci à mes parents et à mon frère (et Emilie) pour tout, vraiment tout. Merci aussi à toute ma famille, nos familles, même celles qui habitent très loin.



SOMMAIRE

1. Curriculum Vitae	4
1.1 <i>Etat civil</i>	4
1.2 <i>Cursus Professionnel, fonctions exercées, mobilité</i>	4
1.3 <i>Diplômes, formations complémentaires, appartenance à des sociétés savantes</i>	5
1.4 <i>Activités de Recherche</i>	6
1.4.1 <i>Thèmes de recherche et financements</i>	6
1.4.2 <i>Collaborations passées et présentes</i>	7
1.4.3 <i>Encadrement</i>	7
1.4.4 <i>Publications scientifiques et valorisation</i>	8
1.5 <i>Activités d'enseignement</i>	13
1.6 <i>Autres activités</i>	14
1.6.1 <i>Activités de prestation de service et d'expertise</i>	14
1.6.2 <i>Activités éditoriales et de reviewing</i>	15
1.6.3 <i>Responsabilités administratives</i>	16
2. Préambule	17
3. De l'immunologie fondamentale...	18
4. ...A l'immunologie appliquée	24
5. Projets de recherche en cours et futurs	31
6. Et la recherche clinique ?	36
7. Conclusion générale	38
8. Liste des références bibliographiques	40
9. Annexes	43

1. CURRICULUM VITAE

1.1 ETAT CIVIL

Mme Delphine LE ROUX - Docteur en Immunologie

Date de naissance : 14 avril 1978 - 44 ans

Corps & Grade : Maître de Conférences Hors-Classe (01/09/2022), 4^{ème} échelon.

Date d'entrée au ministère de l'Agriculture en tant que Maître de Conférences classe normale : 01/09/2012

Section CNECA : 7 (Pathologie Générale animale)

Discipline : Immunologie

ENSEIGNEMENT :

Unité Pédagogique Bactériologie / Immunologie / Virologie (BIV) - Bâtiment Camille Guérin, bureau 309

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort

Adresse électronique : delphine.le-roux@vet-alfort.fr Tel : + 33 (0)1 43 96 70 10 Fax : + 33 (0)1 43 96 71 39

RECHERCHE :

UMR BIPAR (Anses/EnvA/INRAe), Laboratoire de santé animale, Equipe Parasites zoonotiques transmis par les aliments « Paralim », Groupe « Toxoplasma » 14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort

Langues étrangères : Anglais (bilingue), Espagnol (lu, parlé, écrit)

1.2 CURSUS PROFESSIONNEL, FONCTIONS EXERCEES, MOBILITE

04/1997 - 07/1997 : Stage diplômant DUT - *technicienne de laboratoire* - Nottingham Trent University, Dpt of Life Science - Equipe du Pr Robert C. REES, Nottingham - Royaume Uni.

10/1997 - 06/1998 : Stage diplômant - *assistante ingénieur spécialisée en immunologie* - Institut Curie, CNRS UMR218 - Equipe du Pr Thierry SOUSSI, Paris - France,

02/2001 - 07/2001 : Stage diplômant de Maîtrise (ERASMUS) - *assistante ingénieur* - Manchester University, Immunology Dpt - Equipe du Dr Eric B. BELL, Manchester - Royaume Uni.

09/2001 - 07/2002 : Stage diplômant de DEA - *ingénieur d'étude en immunologie* - Institut Curie, INSERM U520 - Equipe du Dr Christian BONNEROT, Paris - France.

10/2002 - 12/2006 : *Doctorante en Immunologie et vacataire d'enseignement* - Institut Curie, INSERM U653 - Equipe du Dr Christian BONNEROT puis du Dr Ana-Maria LENNON-DUMENIL (cause : décès du Dr BONNEROT), Paris - France.

Sujet de Thèse : *Régulation des interactions entre endosomes et cytosquelette pendant la présentation antigénique : un rôle pour la protéine tyrosine kinase Syk.*

03/2007 - 10/2010 : Post doctorat, Institut Cochin, Département de Biologie Cellulaire - Equipe du Dr Florence NIEDERGANG, Paris - France.

Capture de l'antigène dans les cellules dendritiques par macropinocytose et présentation aux lymphocytes B.

12/2010 - 08/2012 : Post doctorat, Institut Cochin, Département d'Immunologie-Hématologie, Equipe du Dr Georges BISMUTH, Paris - France.

Ciblage des macrophages activés dans l'arthrite rhumatoïde par des nanoparticules modifiées

Depuis 09/2012 : Maître de conférences ; discipline Immunologie ; Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort - France.

2003-2006 : Enseignante vacataire en enseignement de biologie cellulaire et physiologie à l'I.U.T. de Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques - Université Paris XII

2010-2014 : Formatrice, formation continue en cytométrie de flux, UFR Sciences du Vivant, Université Paris Diderot, Paris - France.

1.3 DIPLOMES ET FORMATIONS COMPLEMENTAIRES

1.3.1 Formations diplômantes

1997 : **D.U.T. de Biologie Appliquée**, option analyses biologiques et biochimiques - Université Paris XII

1998 : **Certificat d'Etudes Spécialisées Technologiques en Recherche Biomédicale**

Option immunologie - Mention Bien - ESTBA, 56 rue Planchat 75020 PARIS

2000 : **Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie** - Université Paris VI

2001 : **Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie**, option interactions cellulaires et moléculaires.

Mention Assez Bien - Université Paris VI

2002 : **Diplôme d'Etudes Approfondies en Immunologie** - Mention Bien.

Institut Pasteur, Université Paris VI

2006 : **Doctorat d'Immunologie** - Mention très honorable - Université Paris VI

Jury de Doctorat (date soutenance : 15 décembre 2006)

- Dr Ana-Maria LENNON-DUMENIL, directrice de Thèse
- Pr Nicolas GLAICHENHAUS, rapporteur
- Dr Philippe PIERRE, rapporteur
- Dr André ALCOVER, examinateur
- Dr Peter COOPMAN, examinateur
- Pr Pierre-André CAZENAVE, directeur de Jury

1.3.2 Autres diplômes

1998 : Titulaire du B.A.F.A. (Brevet d'Aptitude aux Fonctions d'Animateurs)

2013 : Certificat d'Aptitude à l'Expérimentation Animale de niveau 1 - EnvA

1.3.3 Formations non diplômantes

2013 : formation à la pédagogie, mise en place par le Ministère de l'Agriculture – AgroParisTech, Paris.

(4 semaines de formation à temps complet : 20 jours de formation)

2018 : MOOC en ligne non certifiant « Innate Immunity » dispensé par l'Institut Pasteur, Paris (2h/sem sur 10 semaines).

1.3.4 Appartenances à des sociétés savantes

Depuis 2002 : membre de la Société Française d'Immunologie

1.3.5 Distinctions

2006 : lauréate d'une bourse de voyage de la Société Française d'Immunologie (800€)

2007 : lauréate d'une bourse post-doctorale de la Fondation pour la Recherche Biomédicale (12 mois) puis de la Région Ile-de-France DIM Maladies Infectieuses (24 mois)

2014 : lauréate de l'appel à projet Master 2 du Conseil Scientifique (CS) de l'EnvA

2015 : lauréate de l'appel à projet du CS de l'EnvA – prix : 4000€

2017 : lauréate du prix de la recherche aux journées EnvA (Prix JR 2017), EnvA, Maisons-Alfort, France.

2018 : bourse de voyage Erasmus pour échange-visite avec UCD Vet School, Dublin, Irlande.

2021 : lauréate de l'appel à projet Master 2 du CS de l'EnvA

2022 : lauréate de l'appel à projet AMI transversalité de l'Anses – *Projet GamApi* (26300€)

2022 : promotion au grade de Maître de Conférence Hors-Classe

1.4 ACTIVITES DE RECHERCHE

1.4.1 Thèmes de recherche et financements

- Doctorat d'université (2002-2006) :

Sujet : Régulation des interactions entre endosomes et cytosquelette pendant la présentation antigénique : un rôle pour la protéine tyrosine kinase Syk sous la Direction du Dr Christian Bonnerot puis du Dr Ana-Maria Lennon-Duménil, suite à son décès. Equipe « Immunité et Cancer », Institut Curie, Paris, France.

Financements obtenus : 2002 – 2005 : Bourse MENRT, 2005 – 2006 : Bourse de 4e année ARC

- Premier stage Post-doctoral (2007-2010)

Sujet : Capture des antigènes dans les cellules dendritiques par macropinocytose et présentation aux lymphocytes B sous la Direction du Dr Florence Niedergang, Equipe « Biologie des phagocytes, infection et immunité », Institut Cochin, Paris, France.

Financements : 2007 - 2008 : Bourse Post-doctorale FRM, 2008 - 2010 : Bourse Post-doctorale DIM Maladies Infectieuses de la Région Ile-de France

- Deuxième stage post-doctoral (2010-2012)

Sujet : Ciblage des macrophages activés dans les maladies inflammatoires chroniques par des nanoparticules modifiées sous la Direction du Dr Georges Bismuth, Equipe « Signalisation des cellules immunes et infection rétrovirale »

Financement : 2010-2012 : European Seventh Framework Programme Theme (FP7)

- Depuis septembre 2012 :

Sujet principal : étude de la toxoplasmose chez le chat, mise au point et développement de stratégies vaccinales », dans le groupe « Toxoplasma », au sein de l'équipe Parasites zoonotiques transmis par les aliments (Paralim), UMR BIPAR ANSES/EnvA/INRAE, Laboratoire de santé animale.

Le modèle chat étant très peu étudié, ce projet est abordé selon plusieurs axes stratégiques :

- 1- Développement et amélioration d'un nouveau candidat vaccin ToxoKO sur le modèle chat
- 2- Etude des mécanismes de la réponse immunitaire mucosale du chat vis-à-vis du parasite sauvage et de la souche vaccinale, et identification des différents acteurs.
- 3- Développement d'adjuvants et de nouvelles cibles vaccinales.

Financements : majoritairement par les tutelles de l'UMR (EnvA, Anses et INRAE).

J'ai pu également obtenir des financements supplémentaires :

- Pour le projet de vaccination ToxoKO :
 - o EnvA : obtention d'un financement pour un étudiant M2 sur 2014-2015 (appel à projet)
 - o Vitamféro (*PME détentrice du brevet de la souche vaccinale - participation matérielle*)
- Pour le projet de développement d'explants intestinaux (cf. ci-après)
 - o EnvA : 4000€ suite à l'appel à projet 2015 du Conseil Scientifique
 - o EnvA : obtention d'un financement pour un étudiant M2 sur 2021-2022 (appel à projet)
 - o Anses : 26300 € pour 2022 et 2023 suite à l'« Appel à Manifestation d'Intérêt »

Sujet parallèle, en collaboration avec le Pr Radu Blaga, responsable du groupe « Toxoplasma » : Détection et caractérisation de *Toxoplasma gondii* dans les populations animales en France et en Europe »

1.4.2 Collaborations passées et présentes

- **Isabelle Dimier-Poisson**, Université de Tours. Souche Mic1-3KO et Vaccination contre *T.gondii* – depuis 2012
- **Solen Morisse et Edouard Sèche**, Vitamfero, Université de Tours Souche Mic1-3KO et Vaccination contre *T.gondii* – de 2012 à 2020
- **Isabelle Villena et Dominique Aubert**, Université Reims Champagne Ardenne, France ; Centre National de Référence de la Toxoplasmose, Circulation de *Toxoplasma gondii* dans les populations animales et réduction de la prévalence chez l'homme ; depuis 2012
- **Gereon Schares**, Friedrich-Loeffler Institute, Allemagne ; Détection et circulation des parasites transmis par les aliments (*Toxoplasma*); depuis 2019 (projet EJP OneHealth)
- **Joke van der Giessen, Marieke Opsteegh, Arno Swart**, *Centre for Infectious Disease Control Zoonoses and Environmental Microbiology, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands* Détection et circulation des parasites transmis par les aliments (*Toxoplasma*) ; depuis 2019 (Projet EJP OneHealth)
- **Helga Waap** *Laboratório de Parasitologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal* - Détection et circulation des parasites transmis par les aliments (*Toxoplasma*) ; depuis 2019 (Projet EJP OneHealth)
- **Gunita Deksnė** *Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR, Riga, Latvia* Détection et circulation des parasites transmis par les aliments (*Toxoplasma*) ; depuis 2019 (Projet EJP OneHealth)
- **Pikka Jokelainen** *Infectious Disease Preparedness, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark* Détection et circulation des parasites transmis par les aliments (*Toxoplasma*) ; depuis 2019 (Projet EJP OneHealth)
- **Tatjana Živičnjak**, Department of Parasitology and Parasitic Diseases with clinics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia Circulation de *Toxoplasma gondii* dans les populations porcines en Croatie ; depuis 2022
- **Jean-Michel Repérant**, Unité de Virologie Immunologie parasitologie aviaires et cunicoles, Equipe de parasitologie – Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, France, depuis 2017

1.4.3 Encadrement

Institut Universitaire de Technologie et Brevet de Technicien Supérieur (stages de 2ème année)

- 2014 : Nuran Demirbas - IUT de Génie Biologique, Créteil (10 semaines).
Sujet : études sérologiques d'un vaccin contre la toxoplasmose chez le chat.
- 2016 : Déborah Voisin - IUT de Génie Biologique, Tours (10 semaines).
Sujet : Mise au point d'un modèle d'explants intestinaux pour l'étude des interactions entre T. gondii et son hôte définitif, le chat et suivi sérologique après un essai de vaccination orale.
- 2021 : Tiffanie Lecoustre, BTS Bioanalyses et contrôles, Lycée Pierre-Gilles de Gennes, Paris (7 semaines).
Sujet : Essai d'un nouveau fixateur de globules blancs de carnivores domestiques pour des analyses immunophénotypiques ultérieures en cytométrie de flux.

Licence et Licence Pro

- 2008 - 2009 : Romain SIKORA, étudiant en L3Pro ESTBA, Paris (1 an).
Sujet : Etude de la macropinocytose dans les cellules dendritiques humaines et leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes B.
- 2009 - 2010 : Marion JULITHE, étudiante en L3Pro ESTBA, Paris (1 an).
Sujet : Etude de la macropinocytose dans les cellules dendritiques humaines et devenir intracellulaire de l'antigène – application aux particules du virus de l'hépatite C.
- 2014 : Manon Bordes, étudiante en L2 « Biologie Générale », Paris-Sud, Orsay (2 mois).
Sujet : mise au point d'une technique ELISA de recherche des IgA fécales dirigées contre T. gondii.

- 2016 - 2017 : Yohan Villain étudiant en L3Pro ESTBA, Paris (1 an).
Sujet : Mise au point d'un modèle d'explants intestinaux pour l'étude des interactions entre T. gondii et son hôte définitif, le chat.

Master 2 Recherche :

- 2015 : Clément Chauvin - Master2 Agents Infectieux, Université de Versailles-St Quentin (6 mois).
Sujet : Etude d'efficacité d'un candidat vaccin contre la toxoplasmose chez le chat.
- 2018 : Aicha Yasmine Bellatrèche – Master2 Zoonoses et environnement, Université de Limoges (6 mois)
Sujet : Mise au point d'un modèle de culture organotypique pour l'étude des interactions entre Toxoplasma gondii et son hôte définitif : le chat.
- 2022 : Julie Rouzet Master2 Predictive and Integrative AniMal biology, Université Paris-Saclay (6 mois).
Sujet : Development and use of ex-vivo models to study Toxoplasma gondii cycle on feline intestinal materials

Thèse de doctorat universitaire :

- 2016 : Vitomir Djokic (encadrement à 10%) Prevalence and risk factors for toxoplasmosis in pigs and characterization of natural evolution of infection in a pig model. Directeur de thèse : Pascal Boireau.
Valorisation en commun : 2 articles (à comité de lecture)
- 2021 : Aicha Yasmine Bellatreche (encadrement à 30%), Co-infections à *Toxoplasma gondii* et *Leishmania infantum* chez les animaux de compagnie Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger. Directrice de thèse : Khatima Ait-Oudhia.
Valorisation en commun : 2 articles (revue à comité de lecture), 1 en cours de soumission
- 2022 : Filip Damek (encadrement à 20% puis à 50%) Study of the tropism and persistence of *Toxoplasma gondii*: from pork carcass to sausage and dry ham, a quantitative risk assessment. Directeur de thèse : Radu Blaga.
Valorisation: en commun. 2 articles en cours de préparation ; 5 communications affichées
- 2024 : Lea Grbavac (encadrement à 50% « *co mentoring* »): Prevalence and risk factors for toxoplasmosis in pigs in Croatia. Directrice de thèse : T. Zivicnjak, 50%, (avec participation de Radu Blaga, 10%)
Valorisation en commun : minimum 2 articles en cours de préparation : 1 sur les porcs, 1 sur la faune sauvage

Thèse de doctorat vétérinaire (ENVA, France) :

- 2015 : Directrice de thèse vétérinaire : 1 étudiante (S. Pollet)
- 2017 : Directrice de thèse vétérinaire : 1 étudiante (C.Nadal, *médaille de bronze*)
- 2019 : Directrice de thèse vétérinaire : 3 étudiants (A. Moetus, C. De Geyer d'Orth et M. Le Baut, *médaille d'argent, Prix Leclainche de l'Académie Vétérinaire, Prix de thèse vétérinaire du Groupe Pasteur Mutualité*)
- 2020 : Directrice de thèse vétérinaire : 3 étudiants (C. Thomas, V. Haas et P. Colombe, *médaille d'argent et Prix de thèse de la Société Centrale Canine et Agria*)
- 2021 : Directrice de thèse vétérinaire : 4 étudiants (D. Pehn, L. Melin, M. Barrio, E. Schneider)
- 2022 : Directrice de thèse vétérinaire : 2 étudiants (O. Corbeau, S. Bernard)

1.4.4 Publications scientifiques et valorisations

Nombre par Rang d'auteur	Premier, Deuxième	Avant-dernier dernier	Autre	Total
Articles dans revues à comité de lecture	Premier auteur : 5 Co-premier auteur : 1	Dernier auteur : 4	13	23
Chapitre d'ouvrage	1			1
Communication invitées	9			9
Communication à congrès avec actes (présentation orale/poster)	20	2		22
Communication à congrès sans actes			6	6

Scopus metrics : 356 citations sur 329 documents, *h*-index : 9 Numéro ORCID : 0000-0003-3252-9155

Liste des publications classées par ordre chronologique (de la plus ancienne à la plus récente) :

- Jassem E, Bigda J, Dziadziuszko R, Schlichtholz B, **Le Roux D**, Grodzki T, Rzyman W, Konopa K, Poberezna M, Dobrzanska Z, Skokowski J, Soussi T, Jassem J. *Serum p53 antibodies in small cell lung cancer: the lack of prognostic relevance*. Lung Cancer. 2001 Jan;31(1):17-23

- Vascotto F*, **Le Roux D***, Lankar D*, Faure-Andre G, Vargas P, Guermonprez P, Lennon-Dumenil AM. *Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking*. Curr. Opin. Immunol. 2007 Feb;19(1):93-8. (* contribution égale)

- Vascotto F, Lankar D, Faure-André G, Vargas P, Diaz J, **Le Roux D**, Yuseff MI, Sibarita JB, Boes M, Raposo G, Mougneau E, Glaichenhaus N, Bonnerot C, Manoury B and Lennon-Duménil AM. *The Actin-based motor protein Myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven Antigen Presentation*. J. Cell. Biol. 2007 Mar;26,176 (7):1007-19

- **Le Roux D**, Lankar D, Vascotto F, Yuseff MI, Faure-André G, Yokozeki T, Mougneau E, Glaichenhaus N, Manoury B, Bonnerot C and Lennon-Duménil AM. *Syk regulates Antigen Trafficking and Processing By controlling Actin Remodeling downstream of ITAM-bearing Antigen Receptors*. Mol. Biol. Cell. 2007 Sep;18(9):3451-62

- **Le Roux D** and Niedergang F. *Autophagy et microorganismes : hotspots of a mini-symposium* - Med. Sci. 2010 ; 26 : 534–537.

- **Le Roux D**, Le Bon A, Dumas A, Taleb K, Sachse M, Sikora R, Julithe M, Benmerah A, Bismuth G and Niedergang F. *Antigen stored in Dendritic Cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells*. Blood. 2012 Jan 5;119(1):95-105

- **Le Roux D** and Niedergang F. *New Insights in Antigen encounter by B cells*. Immunobiology 2012 Dec;217(12):1285-91.

- Djokic V, Blaga R, Rinaldi L, **Le Roux D**, Ducry T, Maurelli MP, Perret C, Djurkovic Djakovic O, Cringoli G, Boireau P. *Mini-FLOTAC for counting Toxoplasma gondii oocysts from cat feces--comparison with cell counting plates*. Experimental parasitology 2014 Dec;147:67-71.

- Clement M, Fornasa G, Loyau S, Morvan M, Larghi P, **Le Roux D**, Guedj K, Andreato F, Khallou-Laschet J, Bismuth G, Chiocchia G, Hivroz C, Newman DK, Nicoletti A, Caligiuri G. *Upholding the T cell immune-regulatory function of CD31 inhibits the formation of T/B immunological synapses in vitro and attenuates the development of experimental autoimmune arthritis in vivo* - Journal of autoimmunity 2015 Jan;56:23-33.

- Nogueira E, Lager F, **Le Roux D**, Nogueira P, Freitas J, Charvet C, Renault G, Loureiro A, Almeida CR, Ohradanova-Repic A, Machacek C, Bernardes GJL, Moreira A, Stockinger H, Burnet M, Carmo AM, Gomes AC, Preto A, Bismuth G and Cavaco-Paulo A. *Enhancing methotrexate tolerance with folate tagged liposomes in arthritic mice* - Journal of biomedical nanotechnology 2015 Sept ;11 :2243-2252. (NANOFOL European Consortium)
- Ohradanova-Repic A, Machacek C, Charvet C, Lager F, **Le Roux D**, Platzer R, Leksa V, Mitulovic G, Burkard TR, Zlabinger GJ, Fischer MB, Feuillet V, Renault G, Blüml S, Benko M, Suchanek M, Huppa JB, Matsuyama T, Cavaco-Paulo A, Bismuth G, Stockinger H. *Extracellular Purine Metabolism Is the Switchboard of Immunosuppressive Macrophages and a Novel Target to Treat Diseases With Macrophage Imbalances*. Front Immunol. 2018 Apr 27;9:852. (NANOFOL European Consortium)
- Nadal C, Béguin J, Benchekroun G, **Le Roux D**. *The myeloid derived suppressor cells: Who are they? Can they be used as a diagnostic tool to investigate metastasis in veterinary medicine?* Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2018 Dec;61:5-8
- Delsart M., Dufour B., Arné P., Risco-Castillo V., Bernigaud C., **Le Roux D.**, Guillot J., Rose N. *Évaluation des performances d'une grille de notation des lésions cutanées induites par la gale sarcoptique chez le porc. Approche comparée de la sensibilité et de la spécificité des méthodes de notation visuelle des lésions et d'un test ELISA*. Épidémiol. et santé anim., 2019, 76, 127-140
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Chauvin C, Doré V, Lagrée AC, Voisin D, Villain Y, Grasset-Chevillot A, Boursin F, Su C, Perrot S, Vallée I, Seche E, Blaga R. *Evaluation of immunogenicity and protection of the Mic1-3 knockout Toxoplasma gondii live attenuated strain in the feline host*. Vaccine 2020 Feb 5;38(6):1457-1466
- Hodžić A, Mateos-Hernández L, Fréalle E, Román-Carrasco P, Alberdi P, Pichavant M, Risco-Castillo V, **Le Roux D**, Vicogne J, Hemmer W, Auer H, Swoboda I, Duscher GG, de la Fuente J, Cabezas-Cruz A. *Infection with Toxocara canis Inhibits the Production of IgE Antibodies to α -Gal in Humans: Towards a Conceptual Framework of the Hygiene Hypothesis ?* Vaccines (Basel) 2020 Apr 6;8(2):E167
- Fais T., Nektarios Giadinis N., Papadopoulos E., Brellou G., Theodoridis A., Blaga R., **Le Roux D.**, Bitchava D., Ntemka A., Boscos C., Tsakmakidis I. *Effect of Toxoplasma gondii on Ram Sperm Quality After Experimental Infection*. Pathogens 2020 Nov 30;9(12):1004
- Bellatreche A.Y., Medkour H., Blaga R., **Le Roux D.**, Miroud K, Ait-Oudhia K. *Evaluation of commercial ELISA, indirect immunofluorescence test and qPCR for the diagnosis of Leishmania infantum in asymptomatic dogs from Bouira, northeast Algeria*. Veterinaria, Vol. 70 - issue 1, 2021, 15-25
- Beck B., Grochow T., Gereon S., Blaga R., **Le Roux D.**, Bangoura B., Dausgchies A., Fietz S. A. *Burden and regional distribution of Toxoplasma gondii cysts in the brain of COBB 600 broiler chicken following infection with 76K strain*. Veterinary Parasitology, 2021, aug ; 296
- Bondet V., Le Baut M., Le Poder S., Lécu A., Petit T., Wedlarski R., Duffy D, **Le Roux D**. *Constitutive IFNa protein production in Bats*. Front Immunol 2021 Nov 1;12:735866. eCollection 2021
- Colombe P., Béguin J., Benchekroun G., **Le Roux D**. *Blood biomarkers for canine cancer, from human to veterinary oncology*. Vet Comp Oncol 2022 Dec;20(4):767-777.
- Bellatreche A.Y., Bouzid R., Blaizot A., Aubert D., Blaga R., Ait-Oudhia K., **Le Roux D**. *Comparison of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with the Modified Agglutination Test (MAT) for the*

Detection of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in a Cohort of Hunting Dogs. *Animals (Basel)*. 2022 Oct 18;12(20):2813.

- Dámek F., Swart A., Waap H., Jokelainen P., **Le Roux D.**, Deksne G., Deng H., Schares G., Lundén A., Álvarez-García G., Betson M., Davidson R.K., Györke A., Antolová D., Humníková Z., Wisselink H.J., Sroka J., van der Giessen J.W.B., Blaga R., Opsteegh M. *Systematic Review and Modelling of Age-Dependent Prevalence of Toxoplasma gondii in Livestock, Wildlife and Felids in Europe*. *Pathogens*, 2023 Jan 6;12(1):97. (IF Clarivate 2023 : 4,531)

- Blaga R., Fabres V., Leynaud V., Fontaine J.J., Reyes-Gomez E., Briand A., Crosaz O., Lagrange I., Blaizot A., **Le Roux D.**, Risco-Castillo V., Maksimov P., Guillot J., Teifke J.P., Schares G. *Toxoplasma gondii and Alternaria sp.: An Original Association in an Immunosuppressed Dog with Persistent Skin Lesions*. *Pathogens* 2023 Jan 10;12(1):114. (IF Clarivate 2023 : 4,531)

Communications orale invitées :

- **Le Roux D.**, *Les différentes composantes du système immunitaire et liens entre elles* - Invitation par le R2A2 (Réseau Recherche Antibiotiques Animal) – 21 mars 2014, Maisons-Alfort (94), France. Conférence d'introduction à la journée « Favoriser la résistance des animaux en lien avec l'immunité »

- **Le Roux D.**, *L'intestin et son rôle dans l'immunité chez les animaux sains* - Invitation par l'AFTAA – 7 décembre 2016 - Conférence d'introduction à la journée de formation « immunité et nutrition », Le Mans (72), France

- **Le Roux D.**, *Les acteurs du système immunitaire dans l'intestin des monogastriques* - Invitation par l'AFTAA (Association Française des Techniciens de l'Alimentation Animale) – 7 décembre 2017. Conférence d'introduction à la journée de formation « immunité et nutrition », Le Mans (72), France

- **Le Roux D.**, *Les acteurs du système immunitaire dans l'intestin* - Invitation par OlmixGroup – 29 mai 2018, St Méen le Grand (56), France. Conférence d'introduction au congrès « AlgaSciences »

- **Le Roux D.**, *Immune response induced by the Mic1-3 Knockout T. gondii vaccine strain in the parasite definitive feline host...and other short stories...* - Invitation par le Dr Annetta Zintl, UCD Vet School - 21 octobre 2018, Dublin, Irlande. Echange ERASMUS pour les enseignants

- **Le Roux D.**, *The immune system explained* - Invitation par Kemin - 2 avril 2019, Rome, Italie. Conférence d'introduction à une journée de formation

- **Le Roux D.**, *Immunity in production animals* - Invitation par Novus Itus – 19 septembre 2019, Vilnius, Lituanie. Conférence d'introduction à une journée de formation

- **Le Roux D.**, *Cellular and molecular players of the intestinal immune system* - Invitation par Id4feed – 21 septembre 2020, Annecy (74), France. Conférence d'introduction aux Biosis Days « phyto-genetics as drivers to fight inflammation of digestive systems »

- **Le Roux D.**, *Leveraging immunity to have more resilient pigs* - Invitation par Kemin - 17 septembre 2021, en visioconférence. Conférence d'introduction à la journée de formation « Immunity and nutrition »

Communications orales en congrès en tant que premier ou dernier auteur (présentateur) :

- **Le Roux D.**, Yokozeki T, Lankar D, Mougneau E, Glaichenhaus G, Lennon-Duménil AM and Christian Bonnerot. *A role for Syk kinase in MHC class II-restricted antigen presentation* - Congrès des jeunes chercheurs d'Ile de France, France - avril 2005

- **Le Roux D**, Lankar D, Vascotto F, Yuseff MI, Faure-André G, Yokozeki T, Mougneau E, Glaichenhaus N, Manoury B, Bonnerot C and Lennon-Duménil AM. *Regulation of endosomes-cytoskeleton interactions during antigen presentation : a role for the Syk tyrosine kinase* - Club Exocytose-Endocytose - congrès annuel, France - octobre 2007
- **Le Roux D**, Herit F and Niedergang F. *Antigen uptake by macropinocytosis in human dendritic cells* - Club Exocytose-Endocytose - congrès annuel, France - juin 2008
- **Le Roux D**, Sikora R, Julithe M and Niedergang F. *Antigen macropinocytosed and stored by human dendritic cells can be recycled to activate specific B cells* - Club Exocytose-Endocytose - congrès annuel, France - juin 2010
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Chauvin C, Doré V, Boursin F, Grasset-Chevillot A, Perrot S, Vallée I, Sèche E and Blaga R. *Immune response induced by the Mic1-3 Knockout Toxoplasma gondii vaccine strain in the parasite definitive host : the cat*. Journées IAD2016 (Immunologie des Animaux Domestiques) – France, mars 2016
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Chauvin C, Doré V, Boursin F, Grasset-Chevillot A, Demirbas N, Lagrée AC, Perrot S, Vallée I, Sèche E, Blaga R. *Suivi de la réponse immunitaire induite par la souche vaccinale Mic1-3KO de Toxoplasma gondii, chez son hôte définitif : le chat*. Huitième journée du « Club Toxo », France, novembre 2016
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Voisin D, Chauvin C, Doré V, Lagrée AC, Grasset-Chevillot A, Boursin F, Perrot S, Vallée I, Sèche E et Blaga R. *Suivi de la réponse immunitaire induite par la souche vaccinale Mic1-3KO de Toxoplasma gondii, chez son hôte définitif : le chat*. Journées de la recherche EnvA, France, Juin 2017
- Nadal C, Béguin J, Benchekroun G, **Le Roux D**. *Prospective evaluation of blood myeloid derived suppressor cells as a biomarker of cancer in dogs* - Journées IAD2018 (Immunologie des Animaux Domestiques) - France, avril 2018

Communications écrites :

- **Le Roux D**, Yokozeki T, Lankar D, Mougneau E, Glaichenhaus G, Lennon-Duménil AM and Christian Bonnerot. *A role for Syk kinase in MHC class II-restricted antigen presentation* - Congrès de la Société Française d'Immunologie, France - novembre 2004
- **Le Roux D**, Yokozeki T, Lankar D, Mougneau E, Glaichenhaus G, Lennon-Duménil AM and Christian Bonnerot. *A role for Syk kinase in MHC class II-restricted antigen presentation* - Keystone Symposium on « Lymphocyte Activation and Signaling », Etats-Unis - janvier 2006
- **Le Roux D**, Yokozeki T, Lankar D, Mougneau E, Glaichenhaus G, Lennon-Duménil AM and Christian Bonnerot. *A role for Syk kinase in MHC class II-restricted antigen presentation* - Congrès des jeunes chercheurs d'Ile de France, France - avril 2006
- **Le Roux D**, Yokozeki T, Lankar D, Mougneau E, Glaichenhaus G, Lennon-Duménil AM and Christian Bonnerot. *A role for Syk kinase in MHC class II-restricted antigen presentation* - European Congress of Immunology, France - septembre 2006
- **Le Roux D**, Yokozeki T, Lankar D, Mougneau E, Glaichenhaus G, Lennon-Duménil AM and Christian Bonnerot. *A role for Syk kinase in MHC class II-restricted antigen presentation* - Journée ARC jeunes chercheurs, France - octobre 2006

- **Le Roux D**, Sikora R and Niedergang F. *Antigen uptake by macropinocytosis in human dendritic cells* - Keystone Symposium on « Dendritic Cells », Canada - mars 2009
- **Le Roux D**, Sikora R and Niedergang F. *Antigen uptake by macropinocytosis in human dendritic cells* - Club Exocytose-Endocytose - congrès annuel, France - juin 2009
- **Le Roux D**, Le Bon A, Sachse M, Sikora R, Julithe M, Benmerah A, Bismuth G and Niedergang F. *Stored macropinocytosed antigen by dendritic cells can be recycled under its native form to target specific B cells* - Congrès de la Société Française d'Immunologie, France - novembre 2010
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Chauvin C, Doré V, Boursin F, Grasset-Chevillot A, Perrot S, Vallée I, Sèche E, Blaga R. *Suivi de la réponse immunitaire induite par la souche vaccinale Mic1-3KO de Toxoplasma gondii, chez son hôte définitif : le chat.* - 6e journée d'étude du pôle Santé & Société de l'Université Paris-Est, France – mars 2016
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Voisin D, Chauvin C, Doré V, Boursin F, Grasset-Chevillot A, Demirbas N, Lagrée AC, Perrot S, Vallée I, Sèche E, Blaga R. *Immune response induced by the Mic1-3 Knockout Toxoplasma gondii vaccine strain in the parasite definitive feline host.* - Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, France – novembre 2016
- **Le Roux D**, Djokic V, Morisse S, Voisin D, Chauvin C, Doré V, Lagrée AC, Grasset-Chevillot A, Boursin F, Perrot S, Vallée I, Sèche E, Blaga R. *Immune response induced by the Mic1-3 Knockout Toxoplasma gondii vaccine strain in the parasite definitive feline host.* – Congrès Apicowplexa, Espagne, octobre 2017
- **Le Roux D.**, Blaizot A, Polack B., Lilin T., Blaga R. *Biological tools to study Toxoplasma gondii in its definitive host.* Congrès Apicowplexa, Allemagne, octobre 2019
- **Le Roux D.**, Djokic V., Morisse S., Chauvin C., Dore V., Lagree AC., Voisin D., Villain Y., Grasset-Chevillot A., Boursin F., Su C., Perrot S., Vallée I., Sèche E., Blaga R. *Immunogenicity of the Mic1-3 Knockout Toxoplasma gondii vaccine candidate in the feline host.* Journées du Club Vaccinologie, France, janvier 2020
- Bondet V., Le Baut M., Le Poder S., Lécu A., Petit T., Wedlarski R., Duffy D*, **Le Roux D***. *Constitutive IFN α protein production in bats.* 7th European Veterinary Immunology Workshop Livestreaming, aout 2021.

Communications orales et écrites en congrès en tant que co-auteur :

- Béguin J., Nadal C., Benchekroun G., **Le Roux D**. Prospective evaluation of blood myeloid derived suppressor cells as a biomarker of cancer in dogs. ESVONC, mai 2018, Espagne (présentation orale).
- Dámek F, Swart A, Waap H, Opsteegh M, Jokelainen P, **Le Roux D**, Deksne G, Deng H, Schares G, Lundén A, Álvarez-García G, Betson M, Davidson R, Györke A, Stokman S, Antolová D, Hurníková Z, Wisselink H, Sroka J, Klevar S, Van Spronsen R, Blaga R, Boireau P. *Toxoplasma gondii* prevalence in animals in Europe: a systematic review. One Health European Joint Programs Annual Scientific Meeting, juin 2021, Danemark (poster).
- Dámek F, Swart A, Waap H, Opsteegh M, Jokelainen P, **Le Roux D**, Deksne G, Deng H, Schares G, Lundén A, Álvarez-García G, Betson M, Davidson R, Györke A, Stokman S, Antolová D, Hurníková Z, Wisselink H, Sroka J, Klevar S, Van Spronsen R, Blaga R, Boireau P. *Toxoplasma gondii* prevalence in animals in Europe: a systematic review. 28th international Conference of the world association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP), juillet 2021, Irlande, (poster en ligne)

- Dámek F, Swart A, Waap H, Opsteegh M, Jokelainen P, **Le Roux D**, Deksne G, Deng H, Schares G, Lundén A, Álvarez-García G, Betson M, Davidson R, Györke A, Stokman S, Antolová D, Hurníková Z, Wisselink H, Sroka J, Klevar S, Van Spronsen R, Blaga R, Boireau P. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in European wildlife: a systematic review. 13th European Multicolloquium of Parasitology (EMOP) Serbie, octobre 2021 (présentation orale)

- Dámek F, Swart A, Waap H, Opsteegh M, Jokelainen P, **Le Roux D**, Deksne G, Deng H, Schares G, Lundén A, Álvarez-García G, Betson M, Davidson R, Györke A, Stokman S, Antolová D, Hurníková Z, Wisselink H, Sroka J, Klevar S, Van Spronsen R, Blaga R, Boireau P. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in selected animal species in Europe: a systematic review. Congrès de la société Française de Mycologie Médicale et de la société Française de Parasitologie, France, octobre 2021 (présentation orale)

- Dámek F, Opsteegh M, Waap H, Jokelainen P, **Le Roux D**, Deksne G, Deng H, Schares G, Lundén A, Álvarez-García G, Betson M, Davidson R, Györke A, Antolová D, Hurníková Z, Wisselink H, Sroka J, Klevar S, Van Spronsen R, Blaga R, Swart A. *Systematic review and modeling of the age-dependant prevalence of Toxoplasma gondii in livestock, wildlife and felids in Europe*. Apicowplexa Meeting, Suisse, octobre 2022 (présentation orale et poster)

Chapitre d'ouvrage, ouvrage

- Nicoletti A et **Le Roux D**, « La cytométrie en Flux » Manuel de formation continue - Université Paris-Diderot, UFR Science du vivant - 2010, 2011, 2012, 2013

1.5 ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

J'enseigne l'immunologie générale ainsi que l'immunopathologie depuis septembre 2012, date de mon entrée en fonction en tant que Maître de Conférences (MC) en Immunologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnvA). L'immunologie générale et l'immunopathologie sont enseignées en A2, A3, A4 et A5 (nomenclature post-rentree 2021/2022).

Les vétérinaires ont, parmi leurs missions principales, la vaccination des animaux de compagnie et de rente. Pour mener à bien cette mission, ceux-ci doivent donc maîtriser les connaissances de bases de la réaction immunitaire, c'est-à-dire en identifier les principaux acteurs moléculaires et cellulaires, et expliquer comment ils interagissent entre eux pour protéger l'animal de façon naturelle (lors d'une infection) ou artificielle (vaccination). Au cours de leur carrière, ils rencontreront également des maladies dont l'origine peut venir d'un dysfonctionnement du système immunitaire (les allergies étant un exemple très souvent rencontré en clinique). L'enseignement d'immunologie que je dispense aux étudiants vétérinaires leur donne une base solide de connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire qui leur permettront de :

- Vacciner de façon raisonnée les animaux de compagnie et de rente (médecine préventive)
- Identifier les symptômes d'une pathologie dus à un dysfonctionnement du système immunitaire (déficiences du système immunitaire, cancers, hypersensibilités...)
- Demander, réaliser et interpréter des tests immunologiques pour la détection de différentes maladies.
- Communiquer à leurs pairs et aux propriétaires d'animaux pour pouvoir proposer un traitement ou une prophylaxie adaptée en le justifiant grâce à de solides acquis en immunologie.

J'assure la majorité de ces enseignements avec une majorité de Travaux Dirigés (TD), mais aussi des Cours Magistraux (CM) et des Travaux Pratiques (TP). Deux CM et un TD d'immunopathologie sont dispensés en A3 par d'autres MC de notre Unité Pédagogique (UP). En A2, l'immunologie générale fait partie d'une Unité de Compétence, l'UC « Immunologie et Infectiologie Générales » dont l'acronyme est 2IG et le numéro d'identification est UC64 (re-notée UC0224 à partir de l'année scolaire 2021-2022). Depuis la réforme de 2014, je gère entièrement cette UC, ce qui implique une coordination et une logique pédagogique des différentes

disciplines qui sont enseignées au sein de cette UC. Je gère également l'organisation et la surveillance des évaluations intermédiaires et finales de l'UC. J'interviens aussi ponctuellement en formation continue au sein de l'EnvA (DE d'Ophtalmologie et DE de Pathologie Aviaire) sous forme de CM (stagiaires vétérinaires en activité) ou de conférences pour des entreprises privées.

Mon service d'enseignement et le nombre d'étudiant par promotion depuis 2017, sont en constante évolution, cependant, mon réalisé pédagogique se situe à l'heure actuelle entre 100% et 110% sur les enseignements de catégorie A (117% = 196h Eq TD).

Les enseignements d'immunologie font partie de l'Unité Pédagogique BIV (pour Bactériologie – Immunologie – Virologie) que je dirige depuis 2017 (j'ai été réélue en octobre 2021), qui regroupe une MC en bactériologie, un MC en infectiologie vétérinaire, deux Professeurs de Virologie et moi-même. De novembre 2014 à octobre 2021, j'étais élue en tant que représentante de l'UP BIV au conseil de notre département d'enseignement (DSBP pour Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques).

1.6 AUTRES ACTIVITES ET RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES ET ADMINISTRATIVES

1.6.1 Activités de prestation de service et d'expertise

Je suis régulièrement contactée en tant qu'immunologiste et experte en cytométrie de flux, par des sociétés privées pour des suivis sérologiques d'animaux dans des protocoles d'essais pharmacologiques ou R&D de ces entreprises.

Je participe aussi à des projets de recherche dans le cadre de thèses vétérinaires que je dirige, dans le secteur immunologie du BioPôle (au sein du secteur Bactériologie/Immunologie). Par ce biais, j'aborde d'autres aspects de la réponse immunitaire des animaux et cela enrichit à la fois mes connaissances théoriques et pratiques sur différentes espèces et dans différents domaines comme l'oncologie vétérinaire par exemple. J'interviens aussi dans des projets de recherche d'autres collègues de l'EnvA en tant que responsable du secteur immunologie du BioPôle Alfort en aidant à la conception et/ou la réalisation de techniques immunologiques (ELISA, cytométrie de flux, test de coombs...).

Avec l'arrivée du cytomètre de flux AccuriC6Plus en 2017 au BioPôle, j'ai mis au point des analyses d'immunophénotypage, notamment pour les lymphocytes B et T, ce qui aide au diagnostic de lymphomes et leucémie pour le Centre Hospitalo-Universitaire Vétérinaire des Animaux de Compagnie (CHUV-AC). Suite aux différentes thèses que j'ai dirigées en utilisant cette technologie, nous espérons pouvoir proposer de nouveaux diagnostics aux cliniciens.

1.6.2 Activités éditoriales et de reviewing :

- Depuis 2017 : lecteur critique (« reviewer ») régulier pour les journaux internationaux Parasite&Vectors, PlosOne, Scientific reports, Journal of Immunological Methods, Veterinary & Animal Science, Animals, Antibodies, Pathogens, PlosOne, Biomedical Journal, Journal of Interferon and Cytokines research.

- 2018 - Guest Editor en 2018 pour un numéro special de la revue CIMID (Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases) dont le sujet est “*Recent advances in comparative immunology*”

- 2021 - Guest Editor pour la revue “Frontiers in parasitology” avec Radu Blaga et Frank Seeber du Robert Koch-Institut en Allemagne, pour un sujet special “*Toxoplasma gondii and its Special Host-Pathogen Interactions with its Definitive Host* ».

- 2022 - Guest Editor pour la revue “Veterinary research” pour un sujet special « *Immunological Study of Toxoplasma gondii Infection in Animals* ».

- Expert pour évaluation de projets de recherche pour :
 - Appel à projet de recherche et d'équipement DIM Astrea 2016 (Région Ile-de-France, France)
 - Plan EcoAntibio en 2018, 2019, et 2022 (Ministère de l'Agriculture, France)
 - Joint UdL-USP international research projects en 2019 (Université de Lyon, France)
 - AAP Consortia en 2021 (CHU Nice, France)
- Depuis 2019 : « extern examiner » pour deux modules d'enseignement de l'immunologie « *introduction to pathobiology* » à University College Dublin Veterinary School.

1.6.3 Responsabilités administratives

Positions de responsabilité individuelle

- Responsable de l'UC « Immunologie et Infectiologie Générales » depuis 2014
- « External Examiner » pour deux modules d'enseignement de UCD Vet School Dublin, Irlande depuis 2019
- Responsable secteur « Immunologie » du BioPôle (inclus dans le secteur « bactério-immuno ») depuis 2015
- Responsable de l'UP Bactériologie – Immunologie – Virologie (BIV) depuis 2017
- Directrice Adjointe de l'UMR BIPAR depuis janvier 2021

Participation aux instances internes de l'établissement

- participation au conseil mensuel du DSBP en tant que représentante élue de l'UP BIV de 2017 à 2021
- participation au conseil des enseignants de l'EnvA en tant que membre élue titulaire entre 2017 et 2021, en tant que suppléante depuis 2022
- représentante du DSBP au conseil du DPASP depuis 2017
- membre du comité de suivi du BioPôle et responsable du secteur immunologie depuis la création du BioPôle
- membre du Comité d'Ethique n°16 (EnvA, Anses, UPEC) depuis 2017

Appartenance a des commissions ou des groupes de travail institutionnels

- 2017 et 2021 : membre du conseil scientifique des journées SAPS 2017 et 2021 (« Sciences Animales Paris Saclay »), groupement institutionnel de l'INRAE auquel appartient l'UMR BIPAR.
- Depuis 2017 : membre du comité d'éthique n°16 (EnvA, Anses, UPEC)
- 8 octobre 2019 : membre du comité de titularisation de Mme Anne-Claire Lagrée
- 3 novembre 2020 : membre du comité de titularisation de Mme Adeline Cambron
- Depuis 2020 : membre du Groupe de Concertation Locale de l'Anses (GCL) en tant que représentante de l'EnvA

Participation à des jurys

- Juin/Juillet 2020 : membre du jury de recrutement de concours IE externe INRAE (admissibilité sur dossiers et oraux d'admission)
- Depuis 2017 : membre du jury pour l'épreuve « entretien avec le jury » au concours B d'entrée aux écoles vétérinaires et d'ingénieurs agronomes
- Avril 2021 : membre du jury pour le concours de recrutement post-bac en Ecole Vétérinaire (PACENV)
- Novembre 2022 : membre titulaire de jury de concours pour le recrutement d'un Maître de Conférence en Infectiologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort



2. PREAMBULE

Depuis mon premier stage en tant que technicienne de laboratoire, j'ai su que je voulais travailler sur le système immunitaire. Mon parcours universitaire a donc été particulièrement orienté vers ce domaine jusqu'à mon doctorat en Immunologie. Lors de ma thèse, puis dans mes différents stages post-doctoraux, j'ai ainsi pu travailler sur des aspects fondamentaux de la biologie cellulaire des cellules de l'immunité et comment celle-ci peut influencer l'induction d'une réponse immunitaire, ainsi que sur des aspects plus cliniques comme le ciblage des macrophages activés dans l'arthrite rhumatoïde à l'aide de nanoparticules. Je suis également convaincue que transmettre son savoir est essentiel pour un chercheur, c'est pourquoi, dès que j'ai pu le faire, je suis allée enseigner les matières dans lesquelles j'avais acquis une vraie expertise, c'est-à-dire l'immunologie et la biologie cellulaire, en parallèle de mes études doctorales. C'est donc logiquement que je me suis présentée au poste de Maître de Conférences en Immunologie qu'ouvrait l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort en 2012. La perspective d'enseigner la discipline que je connais le mieux, associée à un projet de recherche ambitieux m'avait particulièrement motivée.

Ce mémoire, rédigé en vue de l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches et soumis à l'analyse du jury, présente les activités de recherche que j'ai menées et que je mène, tout au long de ma carrière de chercheur en immunologie. La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la première moitié de cette carrière, où j'ai appris à maîtriser les principes de l'immunologie fondamentale lors de mon doctorat puis de mon premier stage post-doctoral. La deuxième partie, quant à elle, se concentre sur l'application de ces connaissances et de cette expertise développée en immunologie et biologie cellulaire, dans un contexte de maladie inflammatoire chronique, comme l'arthrite rhumatoïde lors de mon deuxième stage post-doctoral, ou de maladie infectieuse comme la toxoplasmose, que j'étudie depuis mon arrivée à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, en tant que Maître de Conférences. Ainsi, ce manuscrit s'articulera le long de ces deux axes et décrira toutes les étapes qui ont fait de moi l'enseignant-chercheur en recherche vétérinaire que je suis devenue, il se terminera par les projets que je souhaite continuer à développer et étudier au sein de l'UMR BIPAR, dans le contexte « OneHealth » qui relie l'environnement, les hommes et les animaux.

3. DE L'IMMUNOLOGIE FONDAMENTALE...



En tant que Doctorante en Immunologie sur le sujet : Régulation des interactions entre endosomes et cytosquelette pendant la présentation antigénique : un rôle pour la protéine tyrosine kinase Syk. *Directeur de thèse : Christian Bonnerot puis à son décès, Ana-Maria Lennon-Duménil. Institut Curie, Paris.*

Contexte

Les cellules dendritiques (DC), appelées « sentinelles » de l'organisme, font le lien entre l'immunité innée et adaptative. Ces Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) reconnaissent et captent les antigènes (Ag) en périphérie, et les dégradent en peptides antigéniques qu'elles vont associer aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Pendant leur migration vers les ganglions lymphatiques drainant l'infection, les DC vont subir un programme de maturation qui va leur permettre de présenter l'antigène sous forme de complexe peptide antigénique associé aux molécules de classe I du CMH (CMHI) pour activer les lymphocytes T CD8+ (LT CD8+), ou associé aux molécules de classe II du CMH (CMHII) pour activer les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+). Les LT CD4+ ainsi activés, vont aller coopérer avec les lymphocytes B (LB) situés en périphérie du ganglion, dans les follicules. Pour se faire, les LB doivent également présenter l'Ag par l'intermédiaire du CMHII aux LT CD4+ ayant rencontré ce complexe peptide-CMHII une première fois lors du contact avec la DC. Cette coopération T-B est à l'origine de la formation des centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques où les LB vont proliférer et se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité, dirigés contre l'agent infectieux. Une fois activés les lymphocytes retournent au site de l'infection pour exercer leurs fonctions effectrices. Certains de ces lymphocytes B vont devenir des lymphocytes B mémoires. Ce modèle de coopération cellulaire met en évidence le rôle central des CPA comme les DC et les LB dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Le projet de thèse que j'ai mené avait pour but de caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant la capacité des LB à présenter l'antigène (Ag) aux LT CD4+ et plus précisément le rôle de la protéine tyrosine kinase Syk dans ce processus.

Résultats obtenus

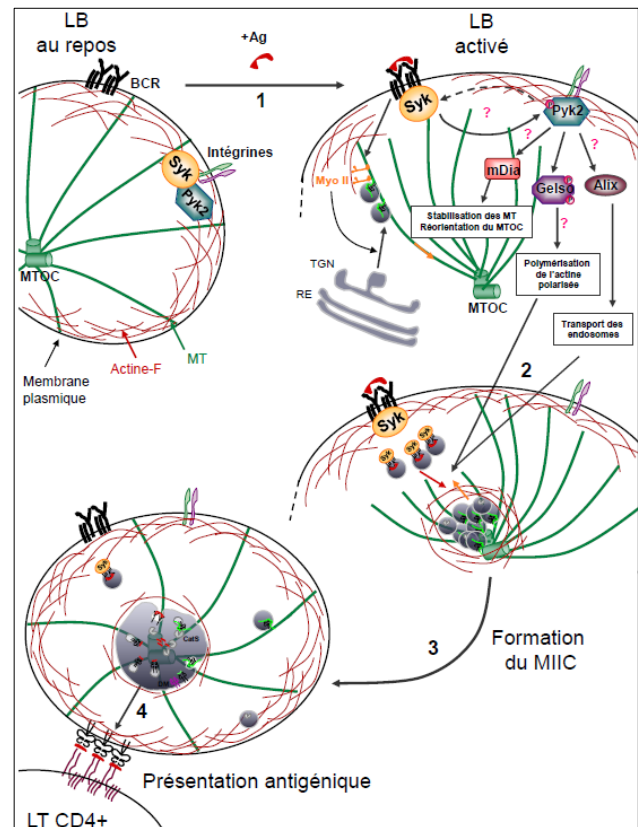
1. Syk contrôle le transport de l'Ag et sa présentation par les LB

Syk est une tyrosine kinase qui est activée en aval de la reconnaissance de l'Ag par son récepteur spécifique exprimé par les cellules présentatrices de l'Ag, telles que les DC, les macrophages et les LB. Le rôle essentiel de cette protéine dans l'internalisation de l'Ag via les récepteurs à la portion Fc des Immunoglobulines G (RFc) a été mis en évidence dans les DC issues de foie fœtal de souris déficientes pour Syk (Sedlik et al., 2003) car l'absence de cette kinase induit une mort précoce des animaux ainsi qu'un arrêt du développement des LB au stade pro-B. Ainsi, en l'absence de modèles *in vivo* pertinents, il était impossible d'étudier le rôle de Syk dans la présentation antigénique, en aval de l'internalisation de l'Ag par le BCR. L'identification et la

caractérisation au laboratoire d'une lignée de LB matures déficients pour Syk nous a fourni un outil nouveau et original pour répondre à cette question. Des essais de présentation antigénique avec cette lignée ou d'autres reconstituées à partir de celle-ci avec la forme sauvage ou mutée dans l'activité kinase de Syk, ont clairement démontré l'implication de cette kinase dans la présentation de certains complexes pept/CMHII aux LT CD4+ (Yokozeki et al., 2003). Le fait que ces trois lignées étaient capables d'activer de manière identique des LT CD4+ lorsqu'on leur ajoutait le peptide directement, indiquait que ce défaut venait d'un problème dans l'apprêtement de l'Ag plutôt que d'un défaut d'expression membranaire des molécules du CMHII en absence de Syk. Je me suis donc ensuite attachée à identifier quels étaient les mécanismes intracellulaires affectés en l'absence de Syk qui induisaient un tel défaut de présentation antigénique. L'analyse par microscopie confocale et biochimie de la production des complexes peptide/CMHII par les différentes lignées de LB citées auparavant, a révélé une diminution de la quantité de complexes générés dans les LB déficients pour Syk ou son activité kinase. De plus, la cytométrie de flux montre que les complexes peptide/CMHII ne sont pas exportés à la surface de manière efficace dans ces cellules. En étudiant les étapes plus précoces du trafic intracellulaire de l'Ag internalisé, j'ai observé un défaut majeur de convergence des endosomes contenant l'Ag vers le centre de la cellule, ayant pour conséquence un retard dans l'acquisition des marqueurs d'acidification et de compartiments d'apprêtement de l'Ag (étude de microscopie confocale et électronique). Ce retard peut être à l'origine du défaut de production des complexes peptide/CMHII. Le transport des organelles intracellulaires est gouverné notamment par le cytosquelette d'actine et les microtubules. Par ailleurs, il a été démontré que la convergence des molécules du CMHII avec H2-DM, et par conséquent l'efficacité de la présentation antigénique, sont dépendantes de l'actine-F (Barois et al., 1998). J'ai donc ensuite étudié les interactions entre endosomes et cytosquelette dans les LB déficients pour Syk et son activité kinase et également dans des LB primaires sauvages traités avec un inhibiteur spécifique de Syk. Nous avons observé que l'absence de Syk dans les LB activés induisait une désorganisation complète du cytosquelette d'actine, par microscopie confocale sur cellules fixées et par vidéomicroscopie. Cette incapacité à contrôler la dynamique du cytosquelette d'actine en absence de Syk pourrait être responsable du défaut de convergence des endosomes induisant un retard dans la formation des complexes peptide/CMHII, altérant ainsi la capacité de ces LB à présenter l'Ag. C'est cette hypothèse que nous avançons à la suite de mes travaux et c'est pourquoi, sur la fin de ma thèse, je me suis attachée à identifier quelle(s) pourrai(en)t être la (les) cible(s) moléculaire(s) de Syk, impliquée(s) dans la réorganisation du cytosquelette d'actine après activation des LB, leur permettant d'aboutir à leurs fonctions effectrices. A la fin de cette thèse, j'ai pu établir un modèle où Syk contrôlerait la présentation Ag des LB dans

le temps et dans l'espace (figure 1). En effet, son transport avec l'Ag vers le centre de la cellule, où convergent les endosomes, empêcherait transitoirement la cellule de proliférer pour lui laisser le temps d'apprêter l'Ag puis de le présenter aux LT CD4+.

Figure 1 : modèle proposé qui montre l'existence d'un réseau d'interactions entre les endosomes et le cytosquelette induites par la stimulation antigénique et régulées par Syk qui permettraient aux LB de mettre en place les trois grandes fonctions indispensables à la coopération T-B : 1 - l'apprêtement de l'Ag, 2 - la migration concomitante du LB vers la zone où se localisent les LT CD4+ et éventuellement - 3 - le contrôle de la prolifération cellulaire durant ce processus. L'implication de voies de signalisation communes permettrait d'intégrer de façon coordonnée ces trois fonctions essentielles en réponse à un signal unique : la stimulation antigénique.



Ce travail de thèse a donc montré pour la première fois l'existence d'un réseau d'interactions entre endosomes et le cytosquelette induites par la reconnaissance de l'Ag et contrôlées par Syk, permettant aux LB de présenter efficacement l'Ag aux LT CD4+ et d'initier les réponses immunitaires spécifiques. **Il a été publié dans *Molecular Biology of the Cell* en mai 2007 pour lequel je suis premier auteur (Le Roux et al., 2007) et est cité dans la revue publiée dans *Current Opinion in Immunology* dont je suis co-premier auteur (Vascotto et al., 2007b).**

2. Rôle de l'actine dans l'apprêtement et la présentation de l'Ag des lymphocytes B

Les travaux de Vascotto et al. publiés dans *The Journal of Cell Biology* en mars 2007, pour lesquels je suis co-auteur (Vascotto et al., 2007a), identifient la myosine II, une protéine moteur associée à l'actine-F, comme essentielle dans le transport dirigé et la convergence des vésicules intracellulaires contenant les molécules du CMHII vers le site d'internalisation de l'Ag des LB. Cette protéine est essentielle à l'apprêtement et à la présentation d'Ag internalisé par le BCR et contrôlerait par conséquent l'efficacité de la présentation antigénique des LB. Ma participation à ce travail a permis de démontrer que l'inhibition de l'activité de la myosine II par son inhibiteur spécifique, la blebbistatine ou par ARN interférence, empêche le regroupement des lysosomes après activation et par conséquent la formation des complexes peptide/CMHII; un phénomène qui rappelle le phénotype des cellules déficientes pour Syk.



En tant que stagiaire post-doctorante junior sur le sujet : Capture des antigènes dans les DC par macropinocytose et présentation aux LB. *Equipe du Dr Florence Niedergang, Institut Cochin, Paris.*

Après quatre années passées à étudier comment les LB présentent l'Ag dégradé sous forme de complexe peptide-CMHII aux LT CD4+, une question restait toujours en suspens : qui apporte les Ag aux LB dans les ganglions lymphatiques, avant leur capture par les LB pour leur présentation aux LT CD4+ ? C'est pour répondre à cette question que j'ai rejoint l'équipe du Dr Niedergang à l'Institut Cochin. L'hypothèse de travail de mon projet était que les DC sont capables de « régurgiter » une partie des Ag non dégradés, propres à la reconnaissance et l'activation des LB. En raison de mes connaissances sur l'activation des LB et sur le trafic intracellulaire des Ag dans les cellules présentatrices, le Dr Niedergang m'a confié la mise au point et le développement d'un projet basé sur la reconnaissance innée des Ag par les DC et sur l'observation de leur capacité à conserver les Ag natifs. **Ayant obtenu les financements nécessaires (bourse post-doctorale FRM puis DIM Malinf, Région Ile-de-France), j'ai pu développer ce projet** en apportant également mes compétences techniques, notamment par la mise au point de nouveaux protocoles dans le laboratoire *in vitro* et *in vivo*, en profitant également des différentes plateformes que possède l'Institut Cochin.

Contexte

La plupart des germes pathogènes envahissent l'organisme par les muqueuses, surfaces internes en contact avec le milieu extérieur. Ainsi leurs propriétés physico-chimiques et les Ac qui y sont secrétés, constituent une première ligne de défense contre ces agents infectieux (ou Ag). La production d'Ac est assurée par les LB et nécessite la reconnaissance de l'Ag natif par ces cellules. Cette rencontre a lieu dans les ganglions lymphatiques et requiert donc un transport de l'Ag de la périphérie vers les ganglions, tout en évitant la dégradation de ce dernier. Pourtant, bien que cruciale dans la mise en place de réponses immunitaires efficaces, cette étape est encore mal connue. Différents types cellulaires ont été impliqués dans la prise en charge et le transport des Ag vers les organes lymphoïdes secondaires : LB, cellules dendritiques folliculaires et macrophages des sinus subcapsulaires (Cyster, 2010). Les DC, qui assurent le transport et la dégradation des Ag pour les présenter aux LT CD4+ et CD8+, sont également de bons candidats pour permettre un transport des Ag sans les dégrader pour les présenter aux LB, notamment en raison de leur grande capacité d'internalisation grâce à leur activité macropinocytique, qui leur permet d'ingérer des Ag de grande taille de façon innée, et leur faible capacité dégradative (Lutz et al., 1997; Savina and Amigorena, 2007). Pourtant le lien entre une telle conservation par ces cellules et un recyclage vers les LB dans les ganglions restait à décrypter au début de ce postdoctorat.

L'objectif de ce projet était donc i) d'étudier l'internalisation d'Ag par macropinocytose dans les DC humaines, une voie encore mal décrite dans ces cellules, et ii) de déterminer dans quelle mesure l'Ag intact

peut être conservé dans des compartiments intracellulaires à partir desquels il pourrait être recyclé pour une présentation aux LB.

Résultats obtenus

J'ai débuté mon post-doctorat en étudiant le mécanisme d'internalisation d'Ag par macropinocytose par les DC humaines, qui étaient beaucoup moins bien caractérisées que les DC de souris. En effet, cette voie d'entrée est utilisée préférentiellement par certains pathogènes et ne fait pas intervenir de récepteurs spécifiques, à l'inverse des autres voies très bien décrites telles que la phagocytose ou l'endocytose dépendante de clathrine (Kerr and Teasdale, 2009; Mercer and Helenius, 2009). J'ai montré que ces cellules présentaient une activité de macropinocytose élevée, qui requiert la polymérisation de l'actine, et est sensible à la wortmannine (inhibiteur de PI3K) et l'amiloride (inhibiteur de l'échangeur sodium/proton), considéré comme drogue inhibant spécifiquement la macropinocytose, et qui agit en fait sur l'activation de protéines G comme Cdc42 (Delamarre et al., 2005; Koivusalo et al., 2010). J'ai mis au point les conditions de transfection des DC humaines par nucléofection qui a permis d'exclure un rôle de la dynamine dans cette voie d'internalisation, ce qui la distingue clairement des autres voies décrites jusqu'à présent. Ces observations ont été confirmées ultérieurement par l'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique. En suivant l'internalisation de trois différents Ag protéiques modèles, j'ai pu montrer que les DC humaines immatures internalisent de manière efficace par macropinocytose les Ag qui se trouvent dans le milieu extérieur. L'observation par microscopie à champ large et électronique, a montré que les macropinosomes sont petits et dispersés dans le cytoplasme de la cellule. Une fois internalisés, les Ag macropinocytés se retrouvent dans des compartiments intracellulaires de type endosomes précoces puis tardifs (CD63+), dans lesquels une majorité reste stockée, plusieurs heures après internalisation. Ces observations sont en accord avec les travaux sur la régulation du pH endosomal des DC murines indiquant que ces cellules sont « peu dégradatives », à l'inverse des macrophages ou des neutrophiles (Amigorena and Savina, 2010). J'ai ensuite établi un test pour mesurer le relargage d'Ag non dégradé, qui repose sur la mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase de raifort (HRP) dont l'activité enzymatique était détectable dans le surnageant de culture des DC. Nous avons pu observer que cette capacité de régurgitation d'Ag natif après internalisation par macropinocytose, était potentialisée en présence de monensine, un inhibiteur du transport des endosomes tardifs vers les lysosomes, indiquant qu'une accumulation de l'Ag stocké dans ces compartiments induisait une augmentation de leur relargage. Ce stockage a été également observé dans des DC immatures transfectées avec des formes inactives de la protéine Rab27, suggérant un rôle pour cette petite protéine G dans le transfert d'Ag natif vers les LB. De manière intéressante, cette capacité des DC à régurgiter l'Ag natif est également sensible au traitement par la chimiokine CXCL13, chimioattractant des lymphocytes B. Par des expériences de RT-PCR et cytométrie de flux, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois, la présence du récepteur à cette chimiokine à la surface des DC immatures humaines, suggérant un possible système de stimulation autocrine et paracrine. Par la suite, nous avons proposé d'utiliser

comme Ag des F(ab')₂, dirigés contre les Ig humaines, couplés à des fluorochromes, capables d'être reconnus et internalisés par les BCR à la surface des LB humains primaires. Ce système nous a permis de montrer que des Ag toujours fluorescents, « régurgités » dans le surnageant des DC, étaient reconnus et internalisés par les LB, signe d'un transfert des DC vers les LB. Par centrifugations différentielles, j'ai pu exclure un rôle des exosomes dans ce relargage de l'Ag natif que nous décrivons dans cette étude. Nous avons pu valider nos observations *in vivo* : après injection des DC chargées de F(ab')₂ anti-IgG murines couplés à des fluorochromes, nous avons observés des LB positifs pour ces F(ab')₂ dans les ganglions drainants par cytométrie de flux et par microscopie confocale. Nous montrons également que les DC trouvées dans les ganglions lymphatiques contenant l'Ag d'intérêt sont positives pour le marqueur CD103, indiquant un phénotype migratoire. Cette observation originale nous permet de prouver que les DC qui capturent un Ag en périphérie, migrent vers les ganglions lymphatiques drainants tout en conservant une partie intacte de l'Ag internalisé afin de le délivrer aux LB. A partir de ces nouvelles données, nous avons pu établir un modèle d'interaction entre les DC et les LB présenté ci-dessous (figure 2).

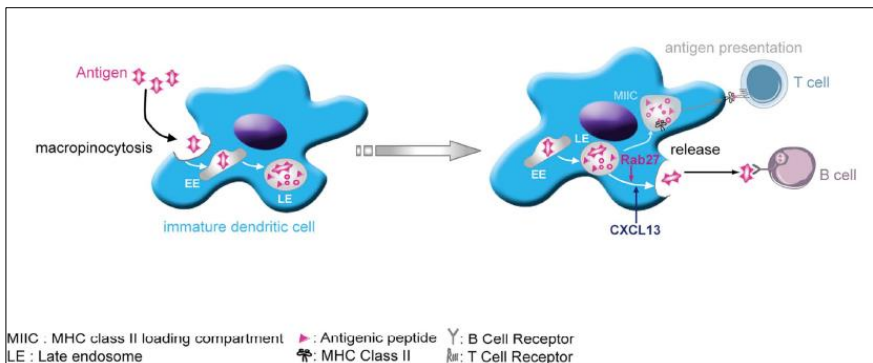


Figure 2 : modèle proposé du rôle central des DC dans la présentation de l'Ag aux LB et leur activation dans les ganglions lymphatiques.

Ce travail ajoute une nouvelle fonction aux capacités peu dégradatives des DC et fait de ces cellules les acteurs essentiels dans la mise en place de réponses immunitaires humorales efficaces. **Ces résultats font l'objet d'un article en premier auteur publié dans Blood en janvier 2012 (Le Roux et al., 2012) et d'une revue publiée dans Immunobiology en décembre 2012 (Le Roux and Niedergang, 2012).** Parmi les auteurs du premier article, figurent aussi deux étudiants de l'ESTBA (Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée), que j'ai encadrés successivement sur ce travail. Ils étaient au niveau « L3Pro/Bachelor », ce qui correspond à une année de spécialisation post-BTS ou post-DUT avec un stage de 9 mois en laboratoire : Romain Sikora (2008-2009) et Marion Julithe (2009-2010). Ils poursuivent à l'heure actuelle leur carrière respectivement en tant qu'attaché de recherche clinique pour l'un et l'autre en tant assistante-ingénieur.

4. ...A L'IMMUNOLOGIE APPLIQUEE



En tant que post-doctorante senior sur le sujet : Ciblage des macrophages activés dans les maladies inflammatoires chroniques par des nanoparticules modifiées. *Equipe du Dr Georges Bismuth, Institut Cochin, Paris.*

Forte de l'expérience acquise pendant mon premier stage post-doctoral avec le Dr Florence Niedergang, sur la manipulation des cellules présentatrices d'Ag telles que les DC ou les macrophages, la mise en place et la gestion de projets de recherche, j'ai pu intégrer l'équipe du Dr Georges Bismuth pour étudier les macrophages activés dans les maladies chroniques inflammatoires. Ces maladies touchent plus de 80 millions de personnes dans le monde et ce nombre ne fait qu'augmenter, pourtant leur traitement reste encore un challenge pour la communauté scientifique et médicale. Les thérapies actuelles sont onéreuses, difficiles à administrer et présentent encore de nombreux effets secondaires potentiellement dangereux. C'est pourquoi il est urgent de trouver de nouveaux traitements constituant une meilleure approche que celles disponibles actuellement. Mes expériences précédentes de recherche étant très axées vers la recherche fondamentale, j'ai voulu appliquer mes connaissances et les enrichir dans ce contexte plus clinique. **Le projet de recherche que le Dr Georges Bismuth m'a confié, s'inscrit dans un large projet de recherche européen impliquant 13 partenaires.** Il propose de développer des nouveaux outils diagnostiques et/ou thérapeutiques basés sur l'utilisation de nanoparticules lipidiques modifiées afin de cibler les macrophages activés responsables de l'établissement de la chronicité des maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, en minimisant le risque d'effets secondaires.

Contexte

La présence d'un grand nombre de macrophages activés est un des signes caractéristiques des maladies inflammatoires chroniques. En plus de leur rôle de cellules phagocytaires, ils jouent de nombreux autres rôles dont la production d'enzymes et de cytokines responsables de l'établissement de la réaction inflammatoire aigüe et chronique. Ils sont donc devenus au cours de ces dernières années, une cible de choix pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Le but du projet proposé par le consortium européen est donc de développer de nouvelles stratégies basées sur des nanoparticules modifiées qui reconnaîtraient spécifiquement les macrophages activés dans l'arthrite rhumatoïde afin de les éliminer et/ou d'éteindre les gènes responsables de leur activation/survie, tout en minimisant les risques d'effets secondaires.

Le récepteur au Folate de type β (RF β) est exprimé spécifiquement par les macrophages activés, c'est pourquoi il est devenu depuis quelques années, un marqueur intéressant pour le diagnostic et les thérapies des maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et aussi des cancers (Turk et al., 2002; Paulos et al., 2004; Turk et al., 2004; Paulos et al., 2006; Low et al., 2008). C'est pour cela qu'il a été choisi comme cible des nanoparticules préparées par le consortium. Afin d'augmenter la spécificité des nanoparticules, il est également

nécessaire de trouver une deuxième molécule-cible exprimée par les macrophages activés dans les lésions arthritiques. Ce projet a donc plusieurs objectifs à atteindre dont la meilleure formulation possible pour ces nanoparticules et l'établissement de la preuve de concept *in vitro* et *in vivo*. A l'aide de modèles murins, nous voulions confirmer l'adressage correct de ces nanoparticules à leurs cellules-cibles et étudier leurs effets sur les macrophages activés *in vitro* et *in vivo* dans des modèles d'arthrite rhumatoïde induite.

Résultats obtenus

Des collaborateurs chimistes impliqués dans le projet ont créé des nanoparticules recouvertes de folate et contenant différentes drogues afin de les adresser aux macrophages activés dans le but de réduire l'inflammation. Pour valider ces nanoparticules *in vivo* nous avons utilisé le modèle d'induction d'arthrite au collagène dans les souris DBA1. Le désavantage de ce modèle est qu'il est long à mettre en place : il faut attendre près d'un mois pour voir apparaître les premiers signes d'inflammation des articulations. Afin d'obtenir des macrophages activés dans un temps réduit, nous avons mis au point un modèle de péritonite par injection de zymozan en intrapéritonéal. Ce protocole permet de récupérer un grand nombre de macrophages péritonéaux murins. Le phénotype de ces cellules montre une expression du RF β qui n'est que très faiblement exprimé par les macrophages résidents isolés à partir de souris témoins injectées au PBS (cf. figure 3A). Des expériences utilisant du folate couplé à des particules de Quantum dots (Qdots) fluorescentes montrent que nous pouvons cibler ce récepteur spécifiquement exprimé par des macrophages activés. Par cytométrie de flux et par microscopie à fluorescence à champ large, nous avons montré que le complexe Folate-Qdots ainsi que des nanoparticules recouvertes de Folate, sont internalisés de façon efficace par les macrophages activés au zymozan (cf. figure 3B). La récente acquisition d'un appareil d'imagerie en bioluminescence et fluorescente nous a permis de suivre permettre de suivre les Qdots couplés au folate injecté dans nos souris arthritiques ainsi que les nanoparticules du consortium contenant les drogues. J'ai également mis au point un protocole de digestion des articulations arthritiques afin d'analyser les populations cellulaires de l'infiltrat inflammatoire par cytométrie de flux. J'ai observé la présence de macrophages exprimant le RF β dans les articulations inflammées et de manière intéressante, leur nombre croît en fonction du score clinique de la maladie. J'ai également montré

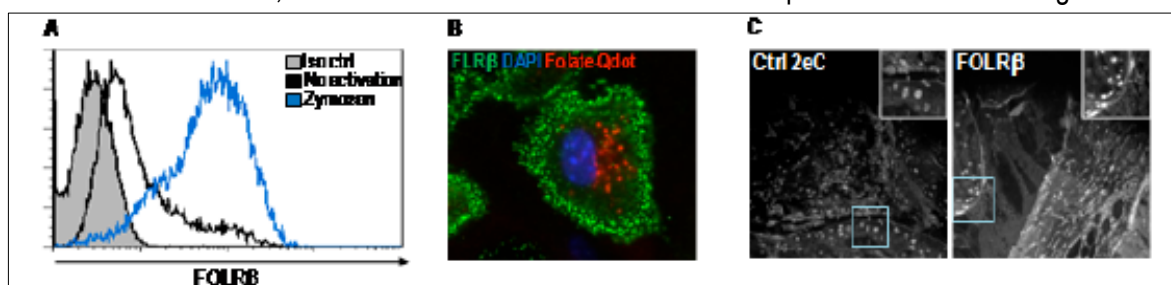


Figure 3 : expression du récepteur β au folate dans les macrophages murins (A) expression du RF β est augmentée dans les macrophages péritonéaux des souris injectées en i.p. avec 1mg de Zymozan. (B) Les macrophages péritonéaux des souris injectées avec du zymozan internalisent des particules de Qdots couplées au folate, qui se localisent près du noyau (rouge). L'expression du RF β est ponctiforme membranaire et sous membranaire (vert). (C) Expression du RF β dans les lésions arthritiques de souris.

l'expression de ce récepteur sur des coupes histologiques des chevilles arthritiques, en collaboration avec la plateforme de morphologie et d'histologie de l'Institut Cochin (cf. figure 3C).

Les résultats des expériences menées pour ce projet du consortium européen, ont été publiés en 2015 dans *Journal of Biomedical Nanotechnology* dans lequel je suis troisième auteur (Nogueira et al., 2015). Cet article montre également l'adressage *in vivo* des nanoparticules vers le RF β exprimé par les macrophages murins péritonéaux activés par la technique du zymozan ainsi que leur internalisation (cf figure 4).

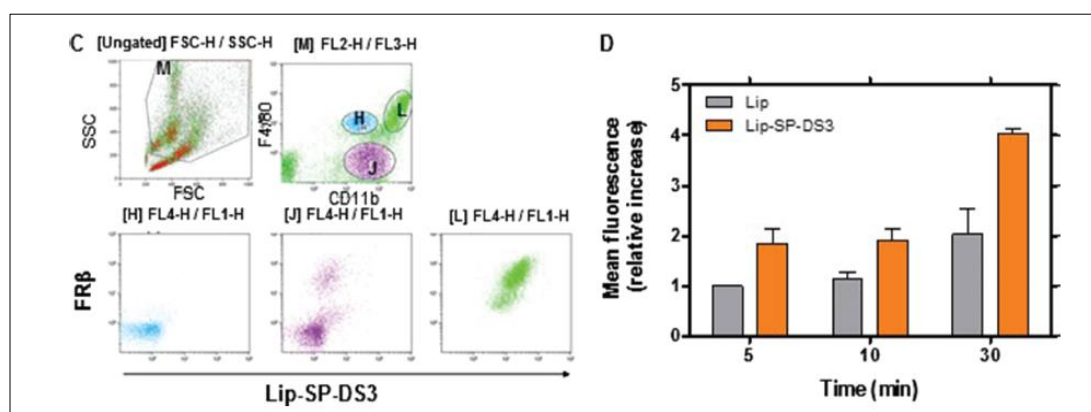


Figure 4 : (C) et (D) Ciblage spécifique *in vivo* des liposomes sur les macrophages péritonéaux de souris injectées avec du zymozan. Les histogrammes en C montrent que seuls les macrophages CD11b^{hi} F4/80^{hi} sont FR β ⁺ (population L) et ont absorbé les liposomes fluorescents (Lip-SP-DS3). Les graphiques en D représentent l'augmentation de la fluorescence dans ces macrophages ayant internalisé les liposomes au fil du temps, comme déterminé par l'analyse de cytométrie en flux. Les valeurs sont la moyenne + écart-type de 2 expériences.

Ces mêmes expériences ont été réalisées dans le modèle murin d'induction d'arthrite par le collagène. Parmi les liposomes du consortium, utilisés ici, certains contenaient du methotrexate (MTX), un médicament couramment utilisé pour traiter les symptômes de l'arthrite rhumatoïde (figure 5). Les résultats montrent un adressage spécifique des liposomes possédant un système de liaison au RF β (Lip-SP-DS3) au niveau des pattes arthritiques, par rapport à des liposomes sans ce système de liaison (Liposomes, figure 5A et 5B). Lorsque le MTX est inclus dans ces liposomes Lip-SP-DS3, son action est potentialisée et le score clinique de l'arthrite des souris sont nettement diminués, par rapport au méthotrexate seul (figure 5C et 5D). Ainsi l'encapsulation du MTX dans ces nanoparticules de nouvelle génération offre une nouvelle perspective de traitement des patients arthritiques ou bien pour réduire l'intolérance acquise à ce médicament, qui peut être observée. Ces résultats ont donc une importance pour la pratique clinique offrant de nouvelles opportunités dans les thérapies contre les maladies inflammatoires chroniques, comme l'arthrite rhumatoïde

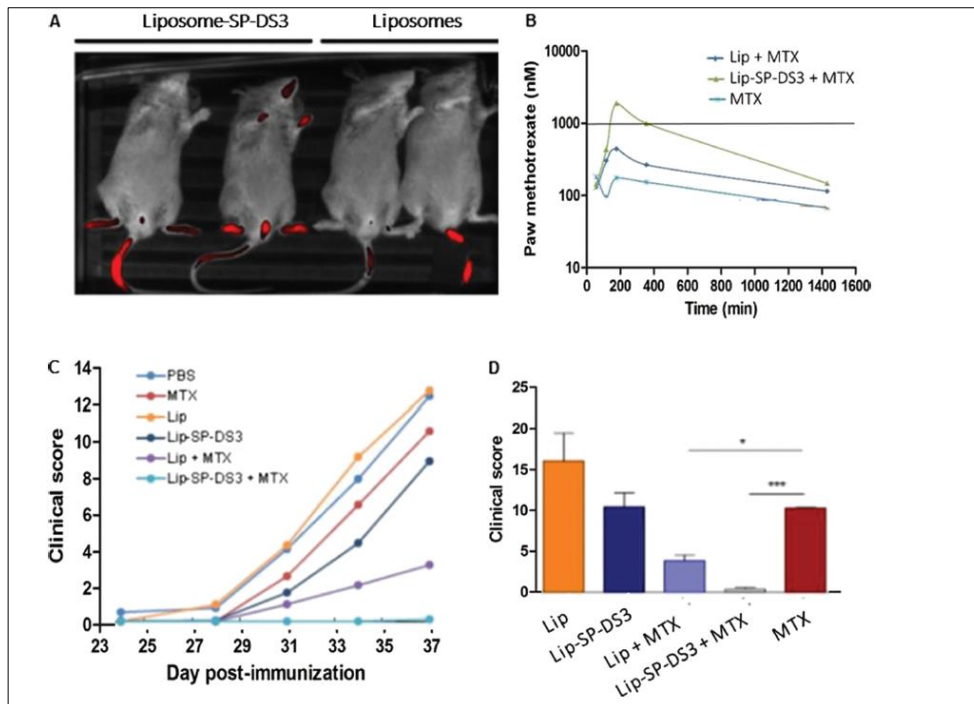


Figure 5 : Ciblage spécifique *in vivo* et efficacité prophylactique des liposomes chez les souris arthritiques. Spécificité de l'absorption *in vivo* de (A) liposomes marqués à l'Alexa Fluor 647 (30 min) et (B) liposomes encapsulant le MTX (après application i.p. de 1,25 mg/kg de MTX). (C et D) Effets cliniques des liposomes encapsulant le MTX sur l'arthrite (score clinique moyen - 12 souris/groupe).

Suite à ce travail collaboratif, les modèles *in vitro* et *in vivo* d'activation des macrophages mis en place dans le consortium Nanofol, et par notre équipe en particulier concernant la partie *in vivo*, ont également été utilisés pour comprendre les dérégulations des interactions entre macrophages et lymphocytes T peuvent amener au développement d'inflammations chroniques, comme l'arthrite rhumatoïde. Notre participation à ce travail a consisté à utiliser notre modèle d'arthrite induite chez la souris, pour confirmer les observations sur les macrophages identifiés par cytométrie en flux dans des synovies de patients humains atteints d'arthrite rhumatoïde. Les macrophages CD11b^{hi} et F4/80^{hi} retrouvés dans les lésions arthritiques des deux espèces, expriment le RF β , signe de leur phénotype activé. De même que chez les humains, les macrophages RF β + murins expriment aussi CD39 et CD73, deux enzymes impliquées dans le métabolisme purinergique de ces cellules, produisant de l'adénosine immunosuppressive. De façon intéressante, le ciblage de ces macrophages RF β +CD39+CD73+ par des nanoparticules de serum albumine humaines couplées à de l'acide folique (pour se lier au RF β) et du méthotrexate, a permis de réduire les lésions arthritiques des souris de façon plus efficace que lorsque que méthotrexate a été administré seul. **Ce travail a été publié en 2018, soit 6 ans après mon arrivée à l'EnvA en tant que Maître de Conférences en Immunologie, dans Frontiers in Immunology (Ohradanova-Repic et al., 2018). Je suis cinquième auteur derrière Céline Charvet, une autre post-doctorante sur le sujet *in vivo* ainsi que Frank Lager, ingénieur d'études.**

En combinant les différentes expertises des partenaires européens dont notre équipe à l'Institut Cochin, ce projet innovant a pu permettre d'optimiser le diagnostic et le traitement des maladies inflammatoires telles

que l'arthrite rhumatoïde. Le projet ainsi que le consortium, a perduré lors du programme européen FP8, faisant suite au FP7 qui a financé ce projet appelé NanoFol, et a abouti à deux autres publications plus récentes en 2020 et 2022 (Guimaraes et al., 2020; Guimaraes et al., 2022) pour lesquels mes travaux pionniers *in vivo* ont servi de base.



En tant qu'enseignant-chercheur à l'EnvA sur le sujet : étude de la toxoplasmose chez le chat, mise au point et développement de stratégies vaccinales.

Le thème de recherche attribué au poste de Maître de Conférences en Immunologie de l'ENVA, proposé au concours 2012, était « étude de la toxoplasmose chez le chat, mise au point et développement de stratégies vaccinales ». Mes compétences en immunologie, biologie cellulaire et modèles animaux, ainsi que mon appétence pour l'enseignement, m'ont poussées à postuler à ce concours à la fin de mon post-doctorat dans l'équipe de Georges Bismuth, et j'ai été reçue. Ma prise de fonction a été effective au 1^{er} septembre 2012.

Mon activité de recherche est menée au sein de l'équipe PARALIM (PARAsite transmis par les ALIMents) dirigée par le Dr Bruno Polack depuis janvier 2017. Notre équipe fait partie de l'Unité Mixte de Recherche BIPAR (Biologie Moléculaire et Immunologie PARAsitaires), dirigée jusqu'en 2020 par le Pr Nadia Haddad avec le Pr Henri-Jean Boulouis, le Dr Isabelle Vallée et le Dr Sarah Bonnet comme Directeurs Adjointes. En 2021, un changement de Direction a eu lieu, l'UMR BIPAR est dirigée maintenant par le Dr Sara Moutailler, et j'ai été nommée Directrice Adjointe. Cette UMR comprend une autre équipe de recherche : MiTick (Microorganismes et Tiques) dirigée par le Dr Ladislav Simo depuis 2021. L'UMR BIPAR a trois tutelles : l'EnvA, l'Anses et l'INRAE. Elle héberge également un Laboratoire National de Référence pour les parasites d'origine alimentaire, et elle est liée aux écoles doctorales ABIES (Agriculture Alimentation Biologie Environnement Santé) d'AgroParisTech et SVS (Sciences de la Vie et de la Santé) de Paris XII.

Contexte

La toxoplasmose est l'une des zoonoses parasitaires due à un parasite protozoaire, *Toxoplasma gondii*. C'est une maladie zoonotique d'importance majeure, de par son impact médical, économique et sociétal. L'infection humaine se fait principalement par voie orale, soit par ingestion d'oocystes extrêmement résistants, rejetés par les chats et les autres félinés (hôtes définitifs, HD) dans l'environnement souillant fruits, légumes ou eau de boisson ; soit par consommation de viande mal cuite contenant des kystes tissulaires (hôtes intermédiaires, HI) (Dubey, 2022). Les félinés sont donc au cœur des problèmes de contamination de l'environnement et du bétail par *T. gondii*. Suivant le concept « one health – une santé », développer un vaccin

ciblant les chats afin de prévenir les contaminations environnementales par *T.gondii* pour protéger la santé publique, est donc une perspectives intéressante (Opsteegh et al., 2015) .

Le développement de vaccins contre la toxoplasmose a été largement freiné par le manque de données disponibles sur le cycle de reproduction sexuée du parasite chez les félins. Ceci est notamment dû aux difficultés rencontré avec le modèle chat (raison éthiques, financières, absence d'anticorps, lignées cellulaires...). Pourtant il n'y a que chez cette espèce animale que ce processus peut être étudié. Nous faisons donc face à un manque cruel d'outils *in vitro* ou *ex-vivo* pour étudier ces questions et permettre la découverte de nouvelles cibles vaccinales.

Résultats obtenus

En collaboration avec Vitamféro, une PME basée à Tours, j'ai mené deux essais vaccinaux chez le chat entre 2012 et 2019, avec leur souche vaccinale candidate appelée ToxoKO, déjà testée et efficace contre l'infection par *T. gondii* chez la souris et le mouton (Ismael et al., 2006) (Mevelec et al., 2010). Les résultats de ces deux essais vaccinaux ont montré que la souche vaccinale ToxoKO était immunogène chez les chats, lorsqu'elle était injectée par voie sous-cutanée ou administrée par voie orale, après la mise au point de formulations gastro-resistantes permettant de conserver la souche vaccinale vivante. Cependant, malgré une forte production d'anticorps IgG et d'IgA anti-*T. gondii*, les animaux vaccinés ont excrété des oocystes infectieux suite au test d'épreuve avec le parasite sauvage. Le génotypage effectué a montré qu'ils étaient issus de la souche sauvage et non de la souche vaccinale, ce qui est en soi une bonne nouvelle pour ce candidat-vaccin, qui est également très bien toléré. Ce travail conséquent a pu être réalisé grâce au soutien financier des tutelles de l'UMR mais aussi d'une aide au partenariat technologiques d'Oséo/BPIFrance (55208€, obtenu avant mon arrivée à l'EnvA), et de l'aide du Conseil Scientifique (CS) de l'EnvA qui a pris en charge le salaire d'un étudiant M2 en 2015, suite à un appel à projet auquel j'ai répondu en tant que porteur. **Cet étudiant a réalisé les analyses sérologiques et cellulaires des prélèvements de cet essai vaccinal ainsi que la recherche d'oocystes dans les matières fécales. Ce projet a été poursuivi et terminé lors d'encadrement d'autres étudiants : Déborah Voisin en 2016 pour son stage diplomant de 2^e année d'IUT ainsi que Yohann Villain en 2016-2017 pour son diplôme de « Bachelor » en Sciences Médicales de l'ESTBA (L3-Pro, stage de 9 mois, gratifié sur les ressources propres de l'UMR). Ces deux étudiants font partie des auteurs de l'article rédigé sur le sujet.** Les résultats de ces essais vaccinaux ont été instructifs mais ont longtemps été bloqués par Vitamféro quant à leur diffusion. Après négociations, ils ont accepté que ces résultats soient présentés sous forme de poster/présentation orale en congrès et après la liquidation de l'entreprise en 2018, sans nous avoir prévenus, j'ai pu rédiger un article dans une revue à comité de lecture, en tant que premier auteur qui a été acceptée en décembre 2019 (Le Roux et al., 2020).

Les résultats un peu décevants en terme de protection des animaux vaccinés contre l'excretion d'oocystes, ont motivé l'orientation de mon thème de recherche vers une meilleure compréhension des interactions hôte-parasite particulières qu'entretient *T. gondii* avec le chat, son hôte définitif. En effet, mieux comprendre les premières étapes de prise en charge du parasite au niveau de l'intestin du chat nous permettra d'expliquer pourquoi, alors que les chats vaccinés ont développé des anticorps contre *T. gondii*, ces anticorps n'ont pas protégé la muqueuse intestinale face à l'infection par le parasite sauvage lors des essais vaccinaux. Ainsi, mon thème de recherche a évolué. Il est maintenant abordé selon les axes stratégiques suivants :

- 1- Etude des mécanismes de la réponse immunitaire mucoale du chat vis-à-vis de *T. gondii* et identification des différents acteurs cellulaires et moléculaires, avec le développement d'outils *ex-vivo* comme les explants intestinaux et/ou les cultures organoïdes d'intestin de chats.
- 2- Etude du cycle sexué du parasite avec les outils *ex-vivo* décrit en (1)

Tout ceci fait partie du programme de recherche que je souhaite continuer de développer au sein du groupe « Toxo » (cf ci-après). En ce sens, j'ai rédigé plusieurs demandes de financements au DIM Maladies infectieuses (2014) puis OneHealth (2017 et 2019) et à l'ED SVS (2018) de l'UPEC, pour notamment obtenir une bourse de thèse, mais ces projets, malgré une bonne évaluation ou un bon classement du candidat, n'ont pas été retenus. **Donc en terme d'encadrement de doctorant, pour l'instant j'ai participé à la thèse de Vitomir Djokic (soutenue en 2016) et ma participation à l'encadrement de Filip Damek s'est accrue au fil des années jusqu'à atteindre 50% pour sa dernière année** (soutenance prévue au premier trimestre 2023), les deux dirigées par le Pr Radu Blaga. **J'ai encadré aussi Aicha Yasmine Bellatreche, vétérinaire et étudiante en thèse de l'ENSV d'Alger, pour la partie expérimentale de sa thèse. J'ai donc été invitée à son jury de soutenance**, car son administration n'a pas accepté une modification de la direction vers une co-direction en cours de thèse. **Cet encadrement a été concrétisé par un article dont je suis dernier auteur (Bellatreche et al., 2022) et un autre dont je fais partie des auteurs (Bellatreche et al., 2021). Je co-encadrerai à partir de 2023, Lea Grbavac, DVM, pour sa thèse d'Université, en collaboration avec Tatjana Živičnjak, Professeur de parasitologie à l'Université de Zagreb.** Je viens également de déposer une demande de demi-bourse de thèse dans un appel à projet de l'Anses, que j'ai obtenue (janvier 2023), ainsi que dans ma participation en tant que partenaire sur un projet ANR qui vient d'être sélectionné pour la 2e phase de soumission (février 2023) et porté par le Dr Frédéric Arieu (Institut Cochin, Paris).

Dans le cadre de ma participation à d'autres projets de recherche d'équipes étrangères, toujours en lien avec *T.gondii*, **j'ai pu figurer parmi les co-auteurs de quatre articles publiés dans des revues à comité de lectures, en 2020 et en 2021 (Fais et al., 2020; Hodzic et al., 2020; Beck et al., 2021; Blaga et al., 2023).** Je participe également au projet EJP ToxoSource, dont Radu Blaga est leader d'un « work package » (WP) et de différentes tâches dans ces WP, notamment dans des méta-analyses sur la séroprévalence de *T. gondii*

chez les animaux et les humains en Europe, dont Filip Damek, notre étudiant en thèse est porteur. Il a ainsi présenté ces travaux préliminaires à différentes conférences internationales en 2020 et 2021, et les publications associées, dans lesquelles je suis co-auteur, commencent à être publiées (Damek et al., 2023).

5. PROJETS DE RECHERCHE EN COURS ET FUTURS

Après avoir développé plusieurs techniques de suivi de la réponse immunitaire féline suite à la réalisation de plusieurs essais vaccinaux chez le chat, avec un nouveau candidat-vaccin entre 2012 et 2019, j'ai donc décidé de développer un modèle de culture cellulaire organotypique *ex-vivo* d'intestin de chats afin de pouvoir étudier le cycle sexué de *T. gondii* et son interaction avec le microenvironnement mucosal félin. Ce modèle a été déjà décrit dans d'autres espèces mais encore jamais chez le chat. **Pour commencer à le développer chez le chat, j'ai pu bénéficier en 2015 d'un soutien de 4000 euros suite à un appel à projet du Conseil Scientifique (CS) de l'EnvA en tant que porteur.** Mais la mise au point du modèle d'explants intestinaux chez les chats prend beaucoup plus de temps que prévu. Ceci est dû en partie au fait de l'augmentation de ma charge d'enseignement et ma participation au diagnostic du BioPôle, ainsi que dans plusieurs instances importantes de l'EnvA. **Avec l'aide de plusieurs étudiants recrutés au niveau DUT/BTS, L3 ou M2,** le modèle a avancé et nous maîtrisons maintenant les techniques de préparation des tissus et d'analyse de cytométrie ou d'ELISA de cytokines produites en aval de la mise en culture par exemple (cf figure 6).

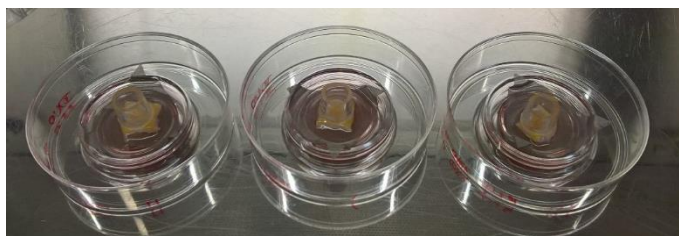


Figure 6 : préparation d'explants avant la mise en culture, selon la technique décrite dans (Tsilingiri et al., 2013), photo ©D. Le Roux

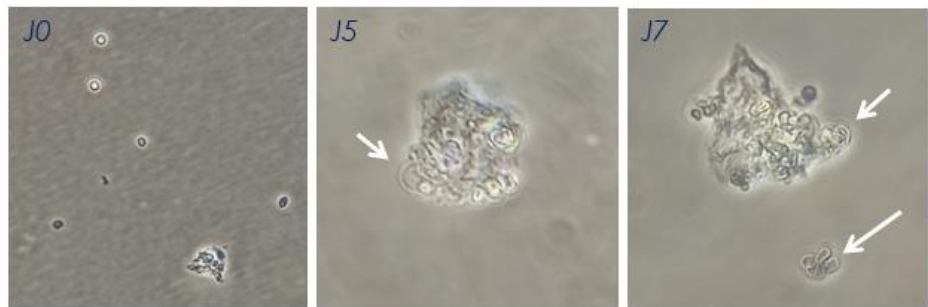
Actuellement, les explants n'ont été utilisés que pour étudier les cinétiques de stimulation courtes dans un incubateur conventionnel. L'achat récent d'un incubateur CO₂/O₂ nous permet maintenant d'augmenter le pourcentage d'O₂ afin de préserver les explants pour des études cinétiques plus longues. En effet, d'après les résultats de ce modèle de culture cellulaire chez d'autres espèces, dans un tel explant non vascularisé, l'O₂ diffuse mal et le tissu est rapidement anoxique dans un incubateur conventionnel (5% CO₂ et 20% O₂), donc une concentration plus élevée d'O₂ (85-100%), ainsi qu'une supplémentation différente du milieu, permettront de maintenir le tissu en vie plus longtemps (Randall et al., 2011; Tsilingiri et al., 2013; Costa et al., 2016). L'approche que nous proposons vise à maintenir l'explant intestinal en vie jusqu'à 72 heures. En effet, l'infection expérimentale de chats par des kystes cérébraux de souris contenant des bradyzoïtes, entraîne une excrétion

des oocystes trois jours post infection (Le Roux et al., 2020; Dubey, 2022). Ainsi, en optimisant les conditions de culture des explants intestinaux félines jusqu'à 72h, il sera possible de travailler ultérieurement sur les différentes étapes du cycle de vie complet du parasite.

Ce modèle de culture d'explant est développé à partir d'intestins de chats autopsiés au BioPôle. Nous avons maintenant une collaboration avec le service de médecine interne du CHUV-AC et notamment avec les Dr Valérie Freiche et Dr Maxime Kurtz, afin de travailler à partir de tissu intestinal issus de chats opérés pour des raisons médicales nécessaires à la santé de l'animal, et avec l'accord du propriétaire, sur la base du même principe que pour l'obtention de tissu intestinal humain.

Je souhaite également comparer le système cellulaire complexe des explants intestinaux félines avec des modèles plus simples afin de montrer l'importance du système immunitaire des muqueuses sur les stades entériques de *T. gondii*. Pour cela, nous mettons en place à l'heure actuelle, le modèle d'organoïdes intestinaux en cultivant des cellules de crypte félines obtenues à partir de tissus intestinaux de chat avec du « vitro-gel » pour organoïdes. En effet, la plupart des organoïdes sont actuellement obtenus en les cultivant dans du matrigel, cependant, ce gel est obtenu à partir de souris (Kozlowski et al., 2021) et nous avons voulu développer et utiliser un système *in vitro* sans animaux autant que possible. Des preuves de concept ont déjà été réalisées sur le développement de structure organoïde-like en utilisant ce gel non dérivé d'animaux, mais des améliorations sont encore nécessaires (données préliminaires et figure 7).

Figure 7 : cinétique d'apparition de structures "organoid-like" (flèches) à partir de cellules de cryptes intestinales en incubateur conventionnel (37°C, 5% CO₂, 20% O₂). Photo ©J. Rouzet & D. Le Roux



La formation de ces structures organoïdes sera suivie en temps réel à l'aide du microscope confocal de l'UMR BIPAR, qui est équipé d'une chambre d'incubation à 37°C et 5% CO₂, 20% O₂. Ce modèle 3D, contenant seulement quelques types cellulaires différenciés, nous permettra de comparer et d'objectiver l'importance du système immunitaire de la muqueuse féline dans le cycle sexuel et asexué de *T. gondii*. Des techniques d'immunologie et de microscopie confocale permettront de valider ce modèle cellulaire.

Nous travaillons également avec une lignée de cellules endothéliales intestinales félines (Berrich et al., 2011), car il a été publié que *T. gondii* peut envahir et sortir des cellules endothéliales du cerveau dans un modèle d'infection chez la souris (Konradt et al., 2016). Nous connaissons bien la culture de cette lignée, et

nous avons pu observer que *T. gondii* pouvait se multiplier de manière asexuée dans ces cellules (données préliminaires, figure 8), ce qui nous permet d'étudier le comportement du parasite dans d'autres types de cellules que les entérocytes, tout en restant dans la même espèce et dans le même environnement intestinal. Ceci nous permettra d'identifier les facteurs épithéliaux spécifiques qui peuvent être

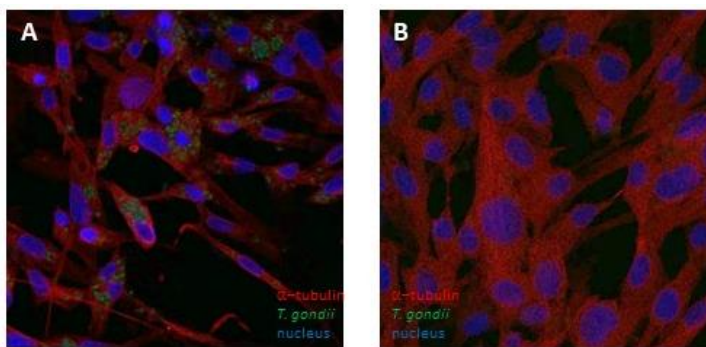


Figure 8 : cellules FINTEC (Feline intestinal Endothelial Cells) infectées (A) ou non (B) avec des tachyzoïtes de *T. gondii* (souche Pru-YFP). Photo ©J. Rouzet & D. Le Roux

responsables de la permissivité de *T. gondii*, en comparant son comportement dans les cellules endothéliales et dans les entérocytes provenant d'organoïdes et d'explants, même en présence d'IgG anti-*T. gondii* (sérum obtenu à partir d'essais de vaccination antérieurs (Le Roux et al., 2020)).

Les explants intestinaux félines ainsi que les organoïdes et les lignées cellulaires, seront utilisés pour explorer la dynamique des interactions entre *T. gondii* et la muqueuse intestinale féline. Le projet commencera par utiliser des tachyzoïtes de différentes souches de *T. gondii*, qui sont disponibles au laboratoire et qui seront appliqués sur les explants intestinaux. Certains d'entre eux sont déjà fluorescents (YFP de la souche RH, génotype I, aimablement fourni par D. Soldati) mais *T. gondii* dans ces cellules peut également être identifié en utilisant des anticorps spécifiques. Nos collaborations au sein du projet commun européen (EJP) ToxoSource, fourniront d'autres tachyzoïtes fluorescents génétiquement modifiés et des anticorps spécifiques de stade pour suivre le parasite à l'intérieur des cellules infectées, par microscopie confocale. Ce modèle nous permettra de pouvoir suivre les étapes de colonisation de l'intestin du chat par *T. gondii* et nous permettra d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour créer de nouveau vaccins ou améliorer ceux existants comme ToxoKO. Le modèle d'explant est composé d'une couche de mucus organisée ainsi que d'une polarité apicale à basolatérale (Tsilingiri et al., 2012; Tsilingiri et al., 2013), fournissant ainsi les caractéristiques d'un microenvironnement muqueux intestinal typique. *T. gondii* peut être appliqué sur la face apicale de l'explant, lorsqu'il est difficile d'accéder à la face luminale des entérocytes des organoïdes. Cependant, cette difficulté a été récemment surmontée dans les organoïdes humains et de souris (Co et al., 2021) et ce nouveau protocole sera appliqué aux organoïdes félines. Une autre possibilité est de passer des organoïdes 3D à la culture 2D (Thorne et al., 2018) et d'infecter les cellules avant ou après la culture 2D, ce qui nous a permis d'observer quelques parasites dans les entérocytes félines à partir d'organoïdes (données préliminaires, figure 9) mais la cinétique est maintenant nécessaire pour suivre le comportement des parasites.

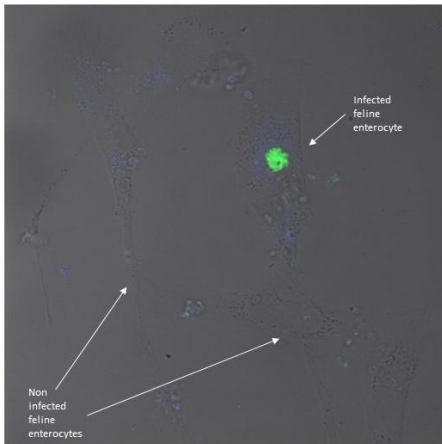


Figure 9 : enterocytes 2D à partir de structures 3D "organoid-like" 3D félines, 2 jours p.i. avec la souche *T. gondii* YFP-Pru. ©J. Rouzet & D. Le Roux.

Les premières étapes de contacts de *T. gondii* avec la muqueuse intestinale se produisent dans les heures qui suivent l'ingestion, de sorte que quelques heures de culture permettront l'étude de ce processus initial. En effet, il a été montré chez la souris que *T. gondii* envahit les entérocytes dans l'heure qui suit le contact avec la muqueuse, et peut également être trouvé dans les CD CD11c⁺ de la lamina propria après 24h (Luu and Coombes, 2015). La majorité des infections chez le chat se produit par l'ingestion de proies infectées, donc principalement par des kystes contenant des bradyzoïtes. Une fois que les bradyzoïtes sortent du kyste, ils évoluent rapidement en tachyzoïtes dans la lamina propria, tandis que les bradyzoïtes restant dans les entérocytes commencent la reproduction sexuée (Dubey, 2022). Par conséquent, il est probable que la réponse immunitaire du chat commence dans la lamina propria contre la forme tachyzoïte de *T. gondii*. Ainsi, nous nous concentrerons d'abord sur l'identification du mécanisme cellulaire et moléculaire initiant la réponse immunitaire féline contre la forme tachyzoïte du parasite, que nous cultivons régulièrement au laboratoire. Il sera par la suite, possible d'influencer le système pour disséquer les interactions entre *T. gondii* et la muqueuse intestinale féline de *T. gondii*. L'utilisation d'anticorps neutralisants pour les cytokines (par exemple IL-12 et IFN γ) ou d'antagonistes TLR, pourrait permettre de découvrir quels récepteurs et/ou cytokines sont essentiels pour activer les cellules immunitaires félines en aval de l'invasion des entérocytes par *T. gondii*. Les chimiokines et cytokines produites dans le système d'explants intestinaux félines ex vivo lors de stimulations avec des parasites *T. gondii* seront examinées par des outils immunologiques disponibles sur le campus (ELISA, cytométrie en flux, Luminex (Wood et al., 2011)) et par des techniques de biologie moléculaire telles que la RT-qPCR ou la PCR multiplexée microfluidique (Koyama et al., 1999 ; Boudreaux et al., 2012), également disponibles. Les organoïdes et les lignées de cellules endothéliales fourniront également des informations sur les cytokines produites lors de l'invasion de *T. gondii* en utilisant les mêmes outils biologiques. Les cellules immunitaires intestinales impliquées dans l'internalisation du parasite seront isolées à partir d'explants intestinaux, identifiées et caractérisées par marquage immunofluorescent suivi d'une cytométrie en flux (Park et al., 2011; Simoes et al., 2012) et d'une microscopie confocale.

Ce projet de recherche dans lequel je m'investis depuis plusieurs années, permettra d'identifier et de caractériser les acteurs de la muqueuse féline qui sont impliqués dans les interactions initiales avec le parasite et l'induction ultérieure d'une réponse immunitaire spécifique, sans utiliser d'animaux vivants. Ce faisant, il complétera les connaissances sur le cycle de vie de *T. gondii* en donnant une image plus pertinente des interactions hôte-pathogène dans la DH et permettra de découvrir de nouvelles cibles pour les adjuvants dans les stratégies vaccinales. Nous espérons également pouvoir observer l'évolution du parasite au contact de la muqueuse féline *in vitro* et générer des oocystes qui pourront être utilisés par la suite pour la communauté scientifique travaillant sur cette forme infectieuse de *T. gondii*. En effet, la plupart des scientifiques travaillent sur les stades infectieux tachyzoïte et bradyzoïte, puisque travailler sur les oocystes nécessite d'infecter expérimentalement des chats. Ce n'était pas un problème majeur jusqu'à la fermeture récente de l'animalerie de l'USDA aux Etats-Unis en 2021 qui fournissait auparavant des oocystes à la communauté scientifique mondiale.

Cette expertise, sur ce modèle de culture particulière m'a permise d'être porteur d'un projet déposé à l'appel à projet « Appel à Manifestation d'Intérêt » de l'Anses en collaboration avec Jean-Michel Repérant du laboratoire de l'Anses-Ploufragan, pour travailler sur la phase sexuée du cycle de développement des Apicomplexa – *Eimeria spp* et *T. gondii*) et pour lequel nous avons obtenu le financement (26 300 euros au total). Je suis également partenaire d'un projet ANR dont la lettre d'intention a été déposée début novembre 2022 et qui a été validé pour passer la 2^e phase de sélection. Ce modèle de culture organotypique représentant une alternative très intéressante à l'expérimentation animale, dans un contexte d'études d'interactions hôte-pathogène délicat (tant au point de vue éthique que technique par le manque d'outils spécifiques pour les chats), **me permet également de déposer une demande de financement à l'appel à projet du FC.3R fin novembre 2022.** Les étudiants que j'ai formés sur ce projet, ont permis de faire avancer le modèle. Nous avons dans notre équipe, une technicienne dédiée à nos thématiques de recherche, qui possède également une expertise en culture cellulaire et en techniques immunologiques, qui sera formée sur le modèle d'explants. Le recrutement d'un(e) doctorant(e) sur cette thématique, permettra de voir le projet aboutir, ce financement faisant partie des différents dossiers récemment déposés.

6. ET LA RECHERCHE CLINIQUE ?

Depuis ma prise de poste à l'EnvA, je suis régulièrement contactée en tant qu'immunologiste et experte en cytométrie de flux, par des sociétés privées pour des suivis sérologiques d'animaux dans des protocoles d'essais pharmacologiques. En 2015, j'ai travaillé avec les entreprises PEPTINOV et INOTREM. Pour cette dernière, j'ai travaillé sur des tests de Coombs et des dosages du complément sur du sang de singes. Pour l'entreprise KEMIN, j'ai réalisé en 2018 une étude sur des cellules mononuclées du sang périphérique de porc via une convention de prestation de service. Ce service a été réalisé dans le secteur Immunologie du BioPôle Alfort. Pour la société OLMIX, je suis intervenue en 2018 également, en tant qu'expert en immunologie et cytométrie de flux dans le cadre d'une convention de recherche pour la mise en place du protocole, l'acquisition et l'analyse des données de cytométrie dans un essai de supplémentation alimentaire chez des poulets de chair. **Chacune de ces conventions étaient dotées respectivement de 344 376 € HT, 6700 € HT, 13305 € HT et 12768 € HT.**

Je participe aussi à des projets de recherche dans le cadre de thèses vétérinaires que je dirige, comme la thèse de Clémence Nadal en 2018 sur les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) canines mesurées par cytométrie de flux, la thèse d'Anne Moetus sur l'effet du stress sur le système immunitaire des chiens de travail, la thèse de Philippe Colombe en 2020 sur la suite du projet MDSCs, ainsi que la thèse de Maxime Le Baut en 2019 sur l'INF α des chauves-souris. **Trois de ces thèses vétérinaires expérimentales ont été lauréates d'une médaille de thèse** (Bronze pour Clémence et Argent pour Maxime et Philippe). **Maxime a également reçu le prix LeClainche de l'Académie Vétérinaire pour son travail de thèse en 2020 ainsi que le prix de thèse vétérinaire du Groupe Pasteur Mutualité. Ces trois thèses ont également été l'objet de publications dont je suis dernier auteur (Nadal et al., 2018 dans la revue CIMID (Nadal et al., 2018) et Bondet, Le Baut et al., 2021 dans Frontiers in Immunology (Bondet et al., 2021)) et la revue issue de la thèse de Philippe Colombe a été accepté dans Comparative Veterinary Oncology en décembre 2022 (Colombe et al., 2022).** Ainsi, dans ce secteur immunologie du BioPôle et au travers des thèses vétérinaires que je dirige, j'aborde d'autres aspects de la réponse immunitaire des animaux et cela enrichit à la fois mes connaissances théoriques et pratiques sur différentes espèces et dans différents domaines comme l'oncologie vétérinaire par exemple.

J'interviens aussi dans des projets de recherche d'autres collègues de l'EnvA en tant que responsable du secteur immunologie du BioPôle Alfort. J'aide à la réalisation de dosage par des techniques immunologiques comme ELISA (dosage de la copeptine canine avec Ghita Benchekroun, dosage d'IgA anti-transglutaminase chez le chat avec Valérie Freiche, dosage d'anticorps anti-Sarcoptes avec Maxime Delsart...).

Avec l'arrivée du cytomètre de flux AccuriC6Plus en 2017 au BioPôle, j'ai mis au point des analyses d'immunophénotypage, notamment pour les lymphocytes B et T, ce qui aide au diagnostic de lymphomes et leucémie pour le CHUVA. Après la validation de ces marquages entre 2017 et 2019, je les réalise maintenant régulièrement au sein du secteur de Bactériologie-Immunologie du BioPôle (le secteur Immunologie est rattaché historiquement à celui de la bactériologie), pour répondre aux demandes des cliniciens, donc notamment pour le service de médecine interne (cancérologie). Suite aux différentes thèses que j'ai dirigées en utilisant cette technologie, nous espérons pouvoir proposer de nouveaux diagnostics aux cliniciens, comme l'identification des anticorps sur les plaquettes pour les thrombocytopenies par exemple (Thèse vétérinaire de Sébastien Bernard, soutenue en octobre 2022).

7. CONCLUSION GENERALE

Les protozoaires relevant de l'embranchement des Apicomplexa, sont des parasites intracellulaires obligatoires très préoccupants pour la santé humaine et animale. Parmi ces parasites, *Toxoplasma gondii*, agent pathogène responsable de la toxoplasmose, est considéré comme le troisième des 31 parasites d'origine alimentaire par la FAO/OMS au niveau européen, menaçant la santé publique. Ce parasite provoque des pertes économiques importantes et représente un réel danger pour le fœtus, le jeune enfant ainsi que les personnes immunodéprimées. En effet, l'incidence annuelle mondiale de la toxoplasmose congénitale a été estimée à 190 100 cas (IC 95 % : 179 300-206 300). Cela correspond à une perte de 1,20 millions (IC 95 % : 0,76-1,90) d'années de vie (DALYs) par an. Cette valeur est particulièrement élevée dans certains pays en développement (Torgerson et al., 2015).

T. gondii est principalement transmis à l'homme par la consommation de viande contaminée insuffisamment cuite provenant d'animaux infectés ou par l'ingestion de légumes ou d'eau contaminés. *T. gondii* peut infecter tout animal à sang chaud mais son hôte définitif est le chat où il effectue son cycle de reproduction sexuée avec libération d'oocystes infectieux dans les fèces. Les chats (et les félinés en général) sont donc au coeur de ce problème de santé publique en maintenant une contamination continue de l'environnement et du bétail par les oocystes. Les méthodes de contrôle actuelles de *T. gondii* ciblent les premiers stades du cycle de vie (schizogonie) et comprennent des antibiotiques à visées humaine ou vétérinaire et un vaccin vivant destiné uniquement aux ovins afin de limiter les avortements et donc les pertes économiques. De plus, il n'existe actuellement aucune mesure de contrôle pour limiter l'excrétion d'oocystes par les chats. Ces observations confirment donc qu'il est maintenant essentiel de se pencher sur le cycle sexué de *T. gondii* chez les félins, afin d'augmenter les connaissances sur le cycle de vie complet de ce parasite transmis par les aliments. Ceci permettra d'étudier ainsi de nouvelles cibles afin d'améliorer le développement de vaccins ciblant les chats, pour prévenir la transmission de cette zoonose aux bétails et aux humains, selon le principe « OneHealth, UneSeuleSanté ».

En tant qu'enseignant-chercheur à l'ENVA, rattachée à l'UMR BIPAR associant ENVA, Anses et INRAE, une de mes missions principales consiste à travailler sur les interactions entre *T. gondii* et son hôte définitif, le chat. Au cours des dix dernières années passées au sein de l'UMR BIPAR, j'ai développé cette thématique avec une approche One Health que ce soit à travers des projets de vaccinations avec de nouveaux candidats vaccins, ou la mise au point de nouvelles méthodes et modèles d'études alternatifs pour travailler sur cette relation particulière qu'entretient *T. gondii* avec son hôte définitif unique. J'ai encadré des stagiaires de DUT, des étudiants de L3 et Master 2, pour développer et appliquer ces méthodes. J'ai eu l'opportunité d'obtenir quelques financements (CS de l'EnvA, AMI Anses) en tant que PI (investigateur principal) pour pouvoir développer ces

modèles alternatifs. Je participe également au deuxième axe de recherche de notre groupe, dirigé par Radu Blaga, incluant notamment des projets Européens d'envergure pour la lutte contre la toxoplasmose (EFSA, OHEJP) et des projets collaboratifs à l'étranger (Grèce, Allemagne, Croatie) portant sur des infections expérimentales ou encore la surveillance épidémiologique de *T. gondii* dans les populations animales. Différents articles dont je fais partie des auteurs sont publiés ou en cours d'écriture sur ces sujets.

Tout en continuant d'assurer mes fonctions d'enseignante en immunologie et de Directrice Adjointe de l'UMR BIPAR, je souhaite à présent poursuivre mes projets de recherche sur l'étude des interactions entre *T. gondii* et la muqueuse intestinale féline, pour définir de nouvelles cibles thérapeutiques ou prophylactiques ciblant les chats, afin de réduire voire arrêter l'excretion d'ocystes dans l'environnement et ainsi protéger la santé animale et humaine. Cette thématique rentre entièrement dans la perspective « OneHealth », c'est pourquoi je vais continuer à répondre à des appels d'offres de financement, notamment au DIM OneHealth 2.0, mais aussi à l'ANR (en tant que partenaire ou porteur) aussi bien pour du fonctionnement mais aussi pour des salaires de doctorant, et post-doctorant dans un futur proche. Les modèles d'études proposés étant développés dans le but d'étudier ces interactions, tout en restant « *in vitro* », me permettent également de demander des financements au nouveau centre FC3R, qui a vu le jour en 2021.

Le recrutement récent de plusieurs nouveaux enseignants-chercheur dans l'équipe Paralim permet également d'entrevoir des transversalités intéressantes et un partage de connaissances scientifiques et techniques sur la thématique des parasites zoonotiques transmis par les aliments, afin d'améliorer les connaissances sur les cycles de vie de ces parasites complexes et d'aboutir à de nouveaux outils de prévention et de diagnostic au service de la santé animale et la santé humaine. J'ai aussi à cœur de continuer à former un binôme de Direction efficace avec Sara Moutailler, la Directrice, afin de permettre notamment à notre UMR de passer sereinement l'évaluation HCERES, qui interviendra en 2024-2025 (Vague E).



8. LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amigorena, S., and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22(1), 109-117. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.022.
- Barois, N., Forquet, F., and Davoust, J. (1998). Actin microfilaments control the MHC class II antigen presentation pathway in B cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13), 1791-1800. doi: 10.1242/jcs.111.13.1791.
- Beck, B., Grochow, T., Schares, G., Blaga, R., Le Roux, D., Bangoura, B., et al. (2021). Burden and regional distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of COBB 500 broiler chickens following chronic infection with 76K strain. *Vet Parasitol* 296, 109497. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109497.
- Bellatreche, A.Y., Bouzid, R., Blaizot, A., Aubert, D., Blaga, R., Ait-Oudhia, K., et al. (2022). Comparison of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with the Modified Agglutination Test (MAT) for the Detection of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in a Cohort of Hunting Dogs. *Animals (Basel)* 12(20). doi: 10.3390/ani12202813.
- Bellatreche, A.Y., H., M., Blaga, R., Le Roux, D., K., M., and Ait-Oudhia, K. (2021). Evaluation of commercial ELISA, indirect immunofluorescence test and qPCR for the diagnosis of *Leishmania infantum* in asymptomatic dogs from Bouira, northeast Algeria. *Veterinaria* 70(1), 15-25. doi: 10.51607/22331360.2021.70.1.15
- Berrich, M., Kieda, C., Grillon, C., Monteil, M., Lamerant, N., Gavard, J., et al. (2011). Differential effects of *Bartonella henselae* on human and feline macro- and micro-vascular endothelial cells. *PLoS One* 6(5), e20204. doi: 10.1371/journal.pone.0020204.
- Blaga, R., Fabres, V., Leynaud, V., Fontaine, J.J., Reyes-Gomez, E., Briand, A., et al. (2023). *Toxoplasma gondii* and *Alternaria* sp.: An Original Association in an Immunosuppressed Dog with Persistent Skin Lesions. *Pathogens* 12(1). doi: 10.3390/pathogens12010114.
- Bondet, V., Le Baut, M., Le Poder, S., Lecu, A., Petit, T., Wedlarski, R., et al. (2021). Constitutive IFN α Protein Production in Bats. *Front Immunol* 12, 735866. doi: 10.3389/fimmu.2021.735866.
- Boudreaux, C.E., Chumbley, L.B., Scott, V.L., Wise, D.A., and Coats, K.S. (2012). Imbalance of placental regulatory T cell and Th17 cell population dynamics in the FIV-infected pregnant cat. *Virology* 9, 88. doi: 10.1186/1743-422X-9-88.
- Co, J.Y., Margalef-Catala, M., Monack, D.M., and Amieva, M.R. (2021). Controlling the polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and infectious diseases. *Nat Protoc* 16(11), 5171-5192. doi: 10.1038/s41596-021-00607-0.
- Colombe, P., Beguin, J., Benchekroun, G., and Le Roux, D. (2022). Blood biomarkers for canine cancer, from human to veterinary oncology. *Vet Comp Oncol* 20(4), 767-777. doi: 10.1111/vco.12848.
- Costa, M.O., Harding, J.C., and Hill, J.E. (2016). Development and evaluation of a porcine in vitro colon organ culture technique. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 52(9), 942-952. doi: 10.1007/s11626-016-0060-y.
- Cyster, J.G. (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol* 11(11), 989-996. doi: 10.1038/ni.1946.
- Damek, F., Swart, A., Waap, H., Jokelainen, P., Le Roux, D., Deksne, G., et al. (2023). Systematic Review and Modelling of Age-Dependent Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Livestock, Wildlife and Felids in Europe. *Pathogens* 12(1). doi: 10.3390/pathogens12010097.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307(5715), 1630-1634. doi: 10.1126/science.1108003.
- Dubey, J.P. (2022). *Toxoplasmosis of animals and humans. 3rd edition* CRC Press. New-York, 313p.
- Fais, T., Giadinis, N., Papadopoulos, E., Brellou, G., Theodoridis, A., Blaga, R., et al. (2020). Effect of *Toxoplasma gondii* on Ram Sperm Quality After Experimental Infection. *Pathogens* 9(12). doi: 10.3390/pathogens9121004.
- Guimaraes, D., Lager, F., Renault, G., Guezguez, J., Burnet, M., Cunha, J., et al. (2022). Folate-Targeted Liposomal Formulations Improve Effects of Methotrexate in Murine Collagen-Induced Arthritis. *Biomedicines* 10(2). doi: 10.3390/biomedicines10020229.

- Guimaraes, D., Noro, J., Loureiro, A., Lager, F., Renault, G., Cavaco-Paulo, A., et al. (2020). Increased Encapsulation Efficiency of Methotrexate in Liposomes for Rheumatoid Arthritis Therapy. *Biomedicines* 8(12). doi: 10.3390/biomedicines8120630.
- Hodzic, A., Mateos-Hernandez, L., Frealle, E., Roman-Carrasco, P., Alberdi, P., Pichavant, M., et al. (2020). Infection with *Toxocara canis* Inhibits the Production of IgE Antibodies to alpha-Gal in Humans: Towards a Conceptual Framework of the Hygiene Hypothesis? *Vaccines (Basel)* 8(2). doi: 10.3390/vaccines8020167.
- Ismael, A.B., Dimier-Poisson, I., Lebrun, M., Dubremetz, J.F., Bout, D., and Mevelec, M.N. (2006). Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *J Infect Dis* 194(8), 1176-1183. doi: 10.1086/507706.
- Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* 10(4), 364-371. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., et al. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol* 188(4), 547-563. doi: 10.1083/jcb.200908086.
- Konradt, C., Ueno, N., Christian, D.A., Delong, J.H., Pritchard, G.H., Herz, J., et al. (2016). Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat Microbiol* 1, 16001. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.1.
- Koyama, T., Omata, Y., Maki, Y., Toyoda, Y., and Saito, A. (1999). Interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 gene expression in cats infected with *Toxoplasma gondii*. *J Vet Med Sci* 61(7), 819-821.
- Kozlowski, M.T., Crook, C.J., and Ku, H.T. (2021). Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol* 4(1), 1387. doi: 10.1038/s42003-021-02910-8.
- Le Roux, D., Djokic, V., Morisse, S., Chauvin, C., Dore, V., Lagree, A.C., et al. (2020). Evaluation of immunogenicity and protection of the Mic1-3 knockout *Toxoplasma gondii* live attenuated strain in the feline host. *Vaccine* 38(6), 1457-1466. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.076.
- Le Roux, D., Lankar, D., Yuseff, M.I., Vascotto, F., Yokozeki, T., Faure-Andre, G., et al. (2007). Syk-dependent actin dynamics regulate endocytic trafficking and processing of antigens internalized through the B-cell receptor. *Mol Biol Cell* 18(9), 3451-3462. doi: 10.1091/mbc.e06-12-1114.
- Le Roux, D., Le Bon, A., Dumas, A., Taleb, K., Sachse, M., Sikora, R., et al. (2012). Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells. *Blood* 119(1), 95-105. doi: 10.1182/blood-2011-02-336123.
- Le Roux, D., and Niedergang, F. (2012). New insights into antigen encounter by B cells. *Immunobiology* 217(12), 1285-1291. doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.011.
- Low, P.S., Henne, W.A., and Doorneweerd, D.D. (2008). Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc Chem Res* 41(1), 120-129. doi: 10.1021/ar7000815.
- Lutz, M.B., Rovere, P., Kleijmeer, M.J., Rescigno, M., Assmann, C.U., Oorschot, V.M., et al. (1997). Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/lysosome-associated membrane protein-1/MHC class II-positive vesicles in immature dendritic cells. *J Immunol* 159(8), 3707-3716.
- Luu, L., and Coombes, J.L. (2015). Dynamic two-photon imaging of the immune response to *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite Immunol* 37(3), 118-126. doi: 10.1111/pim.12161.
- Mercer, J., and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11(5), 510-520. doi: 10.1038/ncb0509-510.
- Mevelec, M.N., Ducournau, C., Bassuny Ismael, A., Olivier, M., Seche, E., Lebrun, M., et al. (2010). Mic1-3 Knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against T. gondii-induced abortion in sheep. *Vet Res* 41(4), 49. doi: 10.1051/vetres/2010021.
- Nadal, C., Beguin, J., Benchekroun, G., and Le Roux, D. (2018). The myeloid derived suppressor cells: Who are they? Can they be used as a diagnostic tool to investigate metastasis in veterinary medicine? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 61, 5-8. doi: 10.1016/j.cimid.2018.10.003.
- Nogueira, E., Lager, F., Le Roux, D., Nogueira, P., Freitas, J., Charvet, C., et al. (2015). Enhancing Methotrexate Tolerance with Folate Tagged Liposomes in Arthritic Mice. *J Biomed Nanotechnol* 11(12), 2243-2252. doi: 10.1166/jbn.2015.2170.

- Ohradanova-Repic, A., Machacek, C., Charvet, C., Lager, F., Le Roux, D., Platzer, R., et al. (2018). Extracellular Purine Metabolism Is the Switchboard of Immunosuppressive Macrophages and a Novel Target to Treat Diseases With Macrophage Imbalances. *Front Immunol* 9, 852. doi: 10.3389/fimmu.2018.00852.
- Opsteegh, M., Kortbeek, T.M., Havelaar, A.H., and van der Giessen, J.W. (2015). Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. *Clin Infect Dis* 60(1), 101-107. doi: 10.1093/cid/ciu721.
- Park, J.S., Mathison, B.D., Hayek, M.G., Massimino, S., Reinhart, G.A., and Chew, B.P. (2011). Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 144(3-4), 455-461. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.08.019.
- Paulos, C.M., Turk, M.J., Breur, G.J., and Low, P.S. (2004). Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 56(8), 1205-1217. doi: 10.1016/j.addr.2004.01.012.
- Paulos, C.M., Varghese, B., Widmer, W.R., Breur, G.J., Vlashi, E., and Low, P.S. (2006). Folate-targeted immunotherapy effectively treats established adjuvant and collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 8(3), R77. doi: 10.1186/ar1944.
- Randall, K.J., Turton, J., and Foster, J.R. (2011). Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol* 27(4), 267-284. doi: 10.1007/s10565-011-9187-5.
- Savina, A., and Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219, 143-156. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x.
- Sedlik, C., Orbach, D., Veron, P., Schweighoffer, E., Colucci, F., Gamberale, R., et al. (2003). A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J Immunol* 170(2), 846-852. doi: 10.4049/jimmunol.170.2.846.
- Simoes, R.D., Howard, K.E., and Dean, G.A. (2012). In vivo assessment of natural killer cell responses during chronic feline immunodeficiency virus infection. *PLoS One* 7(5), e37606. doi: 10.1371/journal.pone.0037606.
- Thorne, C.A., Chen, I.W., Sanman, L.E., Cobb, M.H., Wu, L.F., and Altschuler, S.J. (2018). Enteroid Monolayers Reveal an Autonomous WNT and BMP Circuit Controlling Intestinal Epithelial Growth and Organization. *Dev Cell* 44(5), 624-633 e624. doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.024.
- Torgerson, P.R., Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A.L., Kasuga, F., et al. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med* 12(12), e1001920. doi: 10.1371/journal.pmed.1001920.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., et al. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61(7), 1007-1015. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300971.
- Tsilingiri, K., Sonzogni, A., Caprioli, F., and Rescigno, M. (2013). A novel method for the culture and polarized stimulation of human intestinal mucosa explants. *J Vis Exp* (75), e4368. doi: 10.3791/4368.
- Turk, M.J., Breur, G.J., Widmer, W.R., Paulos, C.M., Xu, L.C., Grote, L.A., et al. (2002). Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46(7), 1947-1955. doi: 10.1002/art.10405.
- Turk, M.J., Waters, D.J., and Low, P.S. (2004). Folate-conjugated liposomes preferentially target macrophages associated with ovarian carcinoma. *Cancer Lett* 213(2), 165-172. doi: 10.1016/j.canlet.2003.12.028.
- Vascotto, F., Lankar, D., Faure-Andre, G., Vargas, P., Diaz, J., Le Roux, D., et al. (2007a). The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation. *J Cell Biol* 176(7), 1007-1019. doi: 10.1083/jcb.200611147.
- Vascotto, F., Le Roux, D., Lankar, D., Faure-Andre, G., Vargas, P., Guermonprez, P., et al. (2007b). Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr Opin Immunol* 19(1), 93-98. doi: 10.1016/j.coi.2006.11.011.
- Wood, B.A., O'Halloran, K.P., and Vandewoude, S. (2011). Development and validation of a multiplex microsphere-based assay for detection of domestic cat (*Felis catus*) cytokines. *Clin Vaccine Immunol* 18(3), 387-392. doi: 10.1128/CVI.00289-10.

Yokozeki, T., Adler, K., Lankar, D., and Bonnerot, C. (2003). B cell receptor-mediated Syk-independent activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Ras, and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 171(3), 1328-1335. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1328.

9. ANNEXES

TABLE DES ANNEXES :

- Annexe A – Présentation factuelle et synthétique de la production des activités 45
- Annexe B – Détails d'encadrement (élèves, tutorat, stagiaires, encadrement de la recherche) 46
- Annexe C – Organigramme de l'UMR BIPAR 49

ANNEXE A – PRESENTATION FACTUELLE ET SYNTHETIQUE DE LA PRODUCTION DES ACTIVITES

(Quand cela n'est pas indiqué, les données correspondent aux activités sur l'ensemble de la carrière)

Heures d'enseignement en eq. TD en formation initiale : 196h Ed.TD/an (+ heures complémentaires)	Heures d'enseignement en eq. TD en formation continue: 6h Eq.TD /an
Nombre et type de responsabilités pédagogiques : 4 1 responsabilité d'UP (UP BIV du DSBP) depuis 2017 1 responsabilité d'UC par an (UC0224) 1 responsabilité d'élue au conseil du DSBP (2017-2021) 1 responsabilité d'élue au conseil des enseignants (2017-2022) – suppléante depuis. 1 responsabilité de représentante du DSBP au conseil du DPASP (depuis 2017)	Nombre moyen d'étudiants encadrés (tutorat, stage, encadrement pédagogique) / an (4 dernières années) moyenne sur 2017-2022 = 4 étudiants /an
Nombre de mission d'enseignement hors établissement (et durée cumulée) Sur l'ensemble de la carrière = 85 mois	Nombre de publication d'enseignement : 1 ^{er} ou 2 ^e auteur : 34 (seul auteur, polycopiés de cours et/ou TD)
Nombre et % d'encadrement depuis 2012 Thèse Université : participation à l'encadrement de 4 thèses universitaires (V. Djokic 10%, Y. Bellatreche 30% et P. Damek, 20% puis 50%, L. Grbavac à partir de 2023 à 50%) Master 2 : 3 (100%) Licence, Master 1 : 1 (100%) BTS, IUT : 3 (100%) Thèses vétérinaires : 14 (100%)	Nombre de publications à comité de lecture : 23 1 ^{er} ou 2 ^e auteur : 6 Avant-dernier ou dernier auteur : 4 Autres places : 13
Nombre de communication à congrès (national (N) ou international (I)) : 21 (N) et 9 (I) Conférence sur invitation : 5 (N) et 4 (I) Conférences autres : (com. orales) 5 (N) et 2 (I) Affiches / poster : 8 (N) et 6 (I)	Types de responsabilités actuelles au service de l'établissement (autres que pédagogiques): Directrice Adjointe de l'UMR BIPAR depuis 2021 Responsable du secteur immunologie du BioPôle depuis 2015
Nombre, types de contrats et montants cumulés : Bourse de voyage SFI (2006 – 800€) 2 contrats post-doctoraux : FRM et DIM Malinf région Ile de France = salaire sur 3 ans (2007-2010) env. 75600 € net 2 Conventions de recherche BioPôle 344 376 € HT + 12768 € HT 2 Conventions de prestation de service BioPôle 6700 € + 13305 € HT 2 Réponses à Appel à Projet Recherche EnvA : 1 Prix CS ENVA = 4000 + 2 Contrats salaire M2 = 3050 euros (pour 6 mois nets) Financement AMI (Anses) 2022-2024 = 26300 euros (total, répartis dans deux équipes)	Nombre et type de jury : - Jury de thèse vétérinaire : 30 (12 en tant que Directrice, 10 en tant qu'assesseur et 8 en tant qu'assesseur ou directrice remplaçante lors de la soutenance) - Jury de stage d'IUT : 2 - Jury de stage de M2 : 3 - Jury de stage de L3 : 1 - Jury de stage L3Pro (ESTBA) : 3 - Jury du concours B depuis 2017 = 6 - Jury de concours IE INRAE (2020) = 1 - Jury du concours post-bac (2021) = 1 - Jury de concours Maître de Conférences = 1
Type et durée de prestation et d'expertises : -Conférences invitées =9x1h -Expert pour évaluation de projets de recherche et/ou équipement : DIM ASTREA 2016 plan EcoAntibio 2018, 2019, 2022 Joint UdL-USP en 2019 AAP Consortia en 2021 -Expert pour lecture critique de manuscrit/articles de recherche dans différents journaux spécialisés -Expertise en immunologie dans des projets de recherche (publics ou privés) avec le BioPôle EnvA depuis 2015	Nombre de commissions et groupes de travail - Membre du comité scientifique d'organisation des journées 2017 et 2021 « SAPS » (Sciences Animales Paris Saclay) - Membre du comité scientifiques d'organisation pour le CIVVET (club d'immunologie et de vaccinologie vétérinaire) pour le congrès en mai 2023. - Membre du comité d'éthique n°16 (1 réunion/mois 192h avec une moyenne de 2 saisines/mois à évaluer)

ANNEXE B – DETAILS D'ENCADREMENT (élèves, tutorat, stagiaires, encadrement de la recherche)

Tutorat d'étudiants vétérinaires :

2013 – 2017 : tutorat d'étudiants vétérinaires – 5 étudiants

2017 – 2022 : tutorat d'étudiants vétérinaires – 14 étudiants

Encadrement d'étudiants vétérinaires pour leur thèse d'exercice :

2015 : *Salomé POLLET*, promo 2015, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Ecologie évolutive du transfert maternel d'anticorps chez les oiseaux*

2017 : *Clémence NADAL*, promo 2017, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Les cellules myéloïdes suppressives : outil diagnostique des cancers canins*

Prix de thèse vétérinaire, médaille de bronze

2019 : *Anne MOETUS*, promo 2019, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Effet du stress sur le système immunitaire des chiens d'utilité*

2019 : *Clémence DE GEYER D'ORTH*, promo 2019, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Défenses et immunité de la Surface Oculaire, étude bibliographique*

2019 : *Maxime LE BAUT*, promo 2019, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Réponse immunitaire anti-virale chez les chiroptères : utilisation d'une nouvelle méthode ELISA digitale dans la détection de l'interféron de type I*

Prix de thèse vétérinaire, médaille d'argent

Prix de thèse de l'Académie Vétérinaire E. LeClainche (2020)

Prix de thèse vétérinaire Groupe Pasteur Mutualité (2020)

2020 : *Charlène THOMAS*, promo 2020, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Edmond Isidore Nocard (1850-1903), vétérinaire, pasteurien et hygiéniste au XIXème siècle*

2020 : *Philippe COLOMBE*, promo 2020, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet de la thèse : *Les biomarqueurs sanguins en oncologie comparative – état actuel des connaissances en 2020 et application aux cellules myéloïdes suppressives canines*

Prix de thèse vétérinaire, médaille d'argent

Prix de thèse vétérinaire Société Centrale Canine (SCC) et Agria Assurance pour Animaux

2020 : *Victor HAAS*, promo 2020, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : *Empreinte immunopathologique de mutations génétiques : cas particulier de syndrome lymphoprolifératif associé à une arthrite systémique*

2021 : *Mickaël Barrio*, promo 2019, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : *Gaston Ramon (1886-1963), vétérinaire et immunologiste d'hier et de demain : les secrets de la transmission d'un savoir*

2021 : *Djessie PEHN*, promo 2021 Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : *les effets de la supplémentation immunostimulante dans l'alimentation sur le système immunitaire des animaux de compagnies et de rentes*

2022 : *Lola MELIN*, promo 2019, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : *Apports de la cytométrie en flux dans le diagnostic en médecine vétérinaire*

2022 : Eileen SCHNEIDER, promo 2022, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : Particularités des anticorps de lama et autres camélidés et leurs intérêts thérapeutiques

2022 : Oriane CORBEAU, promo 2022, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : Les cellules lymphoïdes innées (ILC), implications physiopathologique d'une découverte récente

2022 : Sébastien BERNARD, promo 2022, Directrice de thèse vétérinaire

Sujet : les thrombocytopénies à médiation immune - mise au point d'un test par cytométrie en flux pour détecter la présence d'anticorps anti-plaquettes canines

Encadrement de la recherche :

Niveau IUT :

2014 (3 mois) – Nuran DEMIRBAS, stagiaire de 2e année d'IUT de Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques, Paris XII.

Sujet : études sérologiques d'un vaccin contre la toxoplasmose chez le chat.

2016 (3 mois) – Déborah VOISIN, stagiaire de 2e année d'IUT de Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques, Tours.

Sujet : Mise au point d'un modèle d'explants intestinaux pour l'étude des interactions entre T. gondii et son hôte définitif, le chat et suivi sérologique après un essai de vaccination orale.

2021 : Tiffanie LECOUSTRE, stagiaire 2e année de BTS (T. Lecoustre) au sein du secteur immunologie, laboratoire d'analyses vétérinaire BioPôle, EnvA.

Sujet : Essai d'un nouveau fixateur de globules blancs de carnivores domestiques pour des analyses immunophénotypiques ultérieures en cytométrie de flux.

Niveau L2 :

2014 (2 mois) – Manon BORDE, stagiaire de L2 « Biologie Générale », Paris XI.

Sujet : mise au point d'une technique ELISA de recherche des IgA fécales dirigées contre T. gondii.

Niveau spécialisation post-BTS (équivalent L3Pro, stage de 9 mois):

2008 - 2009 : Romain SIKORA, étudiant en L3Pro ESTBA

Sujet : Etude de la macropinocytose dans les cellules dendritiques humaines et leur capacité de présentation aux lymphocytes B

2009 - 2010 : Marion JULITHE, étudiante en L3Pro ESTBA

Sujet : Etude de la macropinocytose dans les cellules dendritiques humaines et du devenir intracellulaire de l'antigène - Application aux particules du virus de l'hépatite C

2016 - 2017 : Yohan VILLAIN, étudiant en L3Pro ESTBA - *Thème : Mise au point d'un modèle d'explants intestinaux pour l'étude des interactions entre T. gondii et son hôte définitif, le chat*

Niveau Master 2 :

2015 : Clément CHAUVIN, M2 Agents Infectieux, Université de Versailles-St Quentin

Sujet : Etude de l'efficacité d'un candidat vaccin contre la toxoplasmose chez le chat

2018 : Aicha Yasmine BELLATRECHE M2 Zoonose et environnement, Université de Limoges
Sujet : Mise au point d'un modèle de culture organotypique pour l'étude des entre Toxoplasma gondii et son hôte définitif : le chat

2022 : Julie ROUZET du M2 PRIAM, Université de Paris-Saclay
Sujet : Development and use of ex-vivo models to study Toxoplasma gondii cycle on feline intestinal materials.

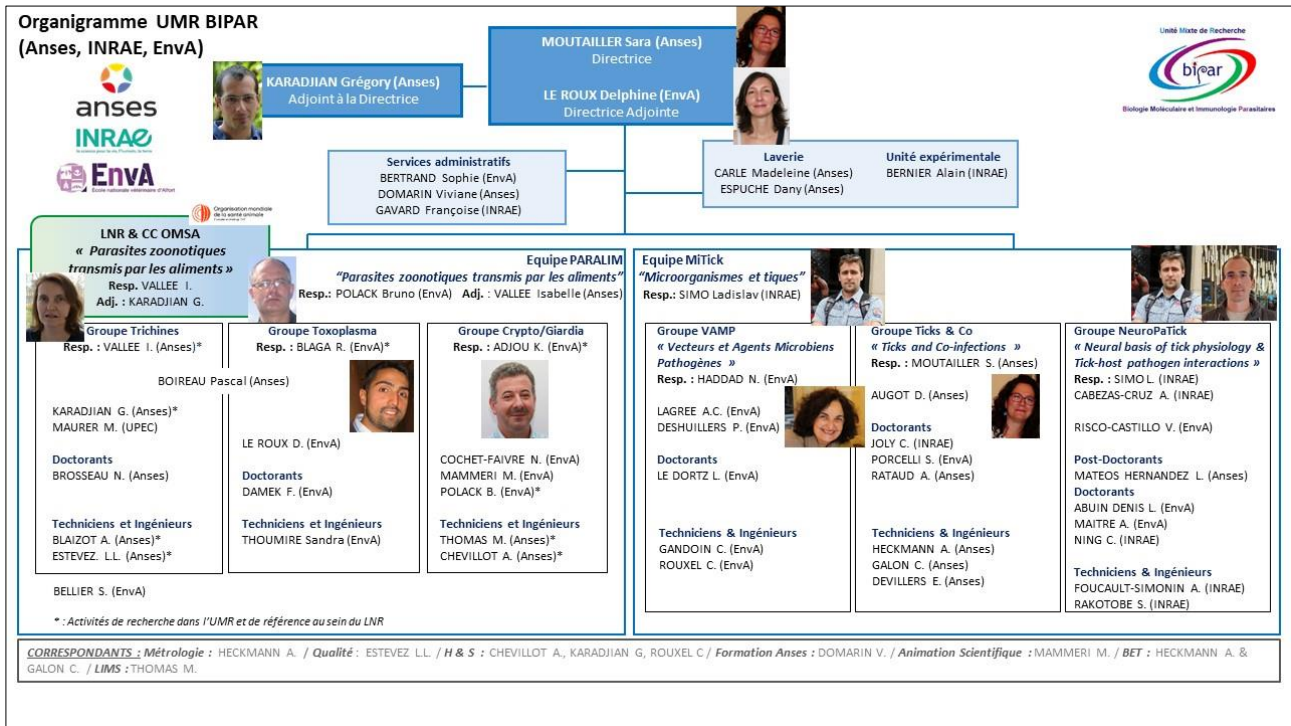
Niveau Thèse d'Université :

2019-2021 : co-encadrante thèse d'Université d'Aicha Yasmine BELLATRECHE (DVM), ENSV Alger (30%)
Sujet : Etude de la co-infection de Toxoplasma gondii et Leishmania infantum chez les animaux de compagnie.

2020-2022 : participation encadrement thèse d'Université de Filip DAMEK (DVM), UPEC (20% puis 50% à partir de 2022)
Sujet : Study of the tropism and persistence of Toxoplasma gondii: from pork carcass to sausage, a quantitative risk assessment

2022-2024 : co-encadrement à 50% de Lea GRBAVAC (DVM) de l'Université de Zagreb, Croatie, pour sa thèse d'Université.
Sujet : Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis in pigs in Croatia.

ANNEXE C – ORGANIGRAMME UMR BIPAR



* : Activités de recherche dans l'UMR et de référence au sein du LNR

CORRESPONDANTS : Métrologie : HECKMANN A. / Qualité : ESTEVEZ LL. / H & S : CHEVILLOT A., KARADJIAN G., ROUXEL C. / Formation Anses : DOMARIN V. / Animation Scientifique : MAMMERI M. / BET : HECKMANN A. & GALON C. / LIMS : THOMAS M.