



**HAL**  
open science

## **Des virus entériques au nématode parasite *Trichinella*; aller et retour entre recherche et expertises**

Pascal Boireau

### ► **To cite this version:**

Pascal Boireau. Des virus entériques au nématode parasite *Trichinella*; aller et retour entre recherche et expertises. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paris XII Val de Marne, 2003. <tel-00790064>

**HAL Id: tel-00790064**

**<https://theses.hal.science/tel-00790064v1>**

Submitted on 19 Feb 2013

**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.



HAL Authorization

**Pascal BOIREAU**  
**UMR BIPAR INRA AFSSA ENVA UPVM**

**DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES  
RECHERCHES**

***CURRICULUM VITAE, ACTIVITE ET PROJETS  
SCIENTIFIQUES***

**Membres du Jury proposés**

**Jean Pierre Lafont, DR1, INRA, Directeur Scientifique**  
**Jean Dupouy-Camet, Pr Parasitologie, Hôpital Cochin, Rapporteur**  
**Pierre-Charles Lefevre CGSV, Conseil Général Vétérinaire, Rapporteur**  
**Philippe Dorchies, Pr Parasitologie, ENVT, Rapporteur**  
**Pierre Perry, DR2, INRA, Examineur**

**Mai 2002**

# Table des matières

<b>DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES</b>	<b>1</b>
<b>Préambule</b>	<b>5</b>
<b>PARTIE 1</b>	<b>6</b>
<b>DES VIRUS ENTERIQUES AU NEMATODE PARASITE <i>TRICHINELLA</i>,</b>	<b>6</b>
<b>I Introduction</b>	<b>7</b>
<b>II Travaux déjà réalisés</b>	<b>7</b>
1 Etude des virus animaux : des gènes à l'antigène	7
1.1 Caractérisation des glycoprotéines et protéines non structurales du coronavirus entérique bovin (BCV).(Station de virologie de l'INRA de Thiverval Grignon puis de Jouy en Josas)	7
1.2 Le parvovirus canin : diagnostic par hybridation moléculaire et identification d'un marqueur de souche vaccinal (LCRV, Maisons Alfort)	9
1.2 Le parvovirus canin : diagnostic par hybridation moléculaire et identification d'un marqueur de souche vaccinal (LCRV, Maisons Alfort)	10
2 <i>Trichinella</i> : de l'antigène aux gènes (LCRV devenu LERPAZ puis UMR BIPAR)	10
2.1 Situation du sujet	10
2.1.1 L'infection par <i>T. spiralis</i> a une importance médicale et économique:	10
2.1.2 L'infection par <i>T. spiralis</i> est un modèle d'étude en parasitologie :	11
2.1.3 Les questions auxquelles je me suis attachées de répondre au cours des recherches menées:	11
2.2 Objectifs	12
2.3.Définition des stades antigéniques de <i>Trichinella</i>	14
2.4 Cartographie des antigènes de <i>Trichinella</i> :	16
2.4.1 Stade L1M:	16
2.4.2 Stade Adulte/L1NN	17
2.5 Gènes conservés et gènes spécifiques de stade.	19
2.5.1 Établissement des banques d'ADNc	19
2.5.2 Validation des banques d'ADNc construites	19
2.5.3 Rôle des familles de gènes conservés dans l'immunité protectrice et la virulence	22
a Rôle des protéines de choc thermique (HSP) dans la relation hôte – parasite	22
b Essai de clonage des gènes des p-Glycoprotéines (pGP) de <i>Trichinella</i>	23
c Caractérisation d'une protéase à sérine de <i>Trichinella spiralis</i> . (AF331156)	23

d Caractérisation du gène de la Myosine (AF331157)	25
2.5.4 Établissement de sous banques spécifiques de stade pour <i>Trichinella spiralis</i>	25
<b>III Présentation de la thématique de recherche</b>	<b>26</b>
1 Un projet d'unité : la création de l'UMR BIPAR et son développement.	27
1.1 Origine.	27
1.2 Le projet scientifique : Présentation du programme de recherche pour la période 1999 à 2002. Vue d'ensemble.	28
1.2.1 Projet fédérateur de Recherche de l'Equipe : L'infestation précoce de la Trichine: immunité intestinale protectrice, déterminisme de la virulence et amélioration du diagnostic.	29
1.2.1.1 Objectifs:	29
1.2.1.2 L'immunité muqueuse anti- <i>Trichinella</i>	30
a Effecteurs de l'immunité protectrice à une infestation par <i>Trichinella</i> :	30
b Cytotoxicité directe ou médiée par des Anticorps monoclonaux spécifiques des stades L1NN, adulte ou L1M.	31
c Analyse de la réponse mastocytaire : Projet de recherche faisant l'objet d'un contrat ECOS 2001-2005	31
1/ Etat actuel du sujet	31
2/: Projet de recherche	32
1.2.2) <i>Pneumocystis carinii</i> chez le lapin et les primates. Modèle pour la pneumocystose humaine	34
1.2.3) Infections à <i>Bartonella</i> : caractérisation du réservoir animal, détection, transmission, modèles animaux expérimentaux.	35
Contexte scientifique	35
1.2 La mise en œuvre du projet de l'UMR BIPAR	37
Etape de stabilisation 1998-1999	37
Etape de développement 1999-2000	37
Etape d'extension et production 2000-2001	37
Thème1 <i>Trichinella</i>	37
1. Axe prophylaxie sanitaire de l'infection à <i>Trichinella</i> : dépistage du parasite dans les viandes et mise sur le marché d'une viande indemne de <i>Trichinella</i> .	37
2. Axe prophylaxie médicale de l'infection à <i>Trichinella</i> : Immunité locale protectrice induite par un nématode parasite.	38
Thème 2 : Maladies transmises par les tiques	40
1. Axe : zoonose, <i>Bartonella</i> maladie émergente transmise par les tiques	40
Etude de l'infection par <i>Bartonella</i> des bovins.	40
Thème 3 : mycologie	40
1. Axe " Circulation de <i>Pneumocystis carinii</i> dans les écosystèmes. "	40
2. Axe " Aspergilloses "Nouveau thème de l'unité	40
<b>2 Le contrat européen TRICHIPORSE 2002-2004</b>	<b>41</b>
2.1 Les objectifs généraux:	41
2.2 Coordination	44

<b>3 Réseau de Collaboration</b>	<b>46</b>
3.1 national	46
3.2 Réseau de collaboration internationale contractualisé	46
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	47
<b>PARTIE 2</b>	<b>50</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>50</b>
<b>ANNEXE 1 : MISSIONS ADMINISTRATIVES, EXPERTISES EFFECTUEES</b>	<b>70</b>
<b>I Commission d'AMM vétérinaire</b>	<b>70</b>
<b>II Mission de normalisation</b>	<b>71</b>
A) AFNOR et CEN (Comité Européen de Normalisation)	71
B) Expertises et membre de Commissions spécialisées	72
1) Membre de la commission de Génie Biomoléculaire (1990-1996)	72
2) Membre de la Commission de génie génétique (1996-..)	72
3) Consultant à l'OIE en Biotechnologie depuis 1990	72
<b>ANNEXE 2 CONGRES INTERNATIONAL SUR LA TRICHINELLOSE</b>	<b>74</b>
<b>Dixième Conférence Internationale sur la Trichinellose Fontainebleau, France, 20-24 Août 2000</b>	<b>74</b>
<b>ANNEXE 03: ACTIVITE DE LABORATOIRE DE REFERENCE</b>	<b>78</b>
<b>A L'épidémie de Trichinellose d'octobre 1998</b>	<b>79</b>
1°) Synthèse	79
2°) Propositions dans le contexte de la crise	79
<b>B Activités du laboratoire de référence pendant les années 1999, 2000 et 2001.</b>	<b>80</b>
1°) La formation	80
2°) La confirmation des deux premiers chevaux bloqués pour trichinellose en France	80
3°) La mise en place d'un contrôle systématique chez le porc plein air.	80
4°) Une première enquête Trichinellose du sanglier.	81
<b>ANNEXE 04: DOCUMENTS D'EVALUATION COLLECTIVE , LETTRES DE SOUTIEN</b>	<b>83</b>

## **Préambule**

Ce mémoire préparé en vue d'obtenir une habilitation à diriger des recherches est présenté en deux grandes parties. La première partie décrit les résultats acquis, les principaux axes de recherche développés au cours de 15 années durant lesquelles cette activité s'est effectuée de façon alternative au LCRV et à l'INRA. Si l'essentielle de mes missions fut d'abord une pratique de la recherche, j'ai progressivement été amené à partir de 1993 à initier des axes stratégiques et à animer la recherche de l'unité.

La seconde partie présente mon curriculum vitae de façon synthétique avec un bilan des productions scientifiques. La première partie fait référence aux publications ordonnées dans la seconde partie selon des règles classiques (Publications internationales (Pn), publications techniques (diffusion nationale), participation à des congrès (Cn)....)

Etant Inspecteur en Chef de la Santé Publique Vétérinaire (anc. Vétérinaire Inspecteur), j'ai dû assurer un certain nombre de missions à caractère administratif. D'abord rapporteur à la commission d'AMM vétérinaire pour les sérums et vaccins, je me suis progressivement impliqué dans des missions d'expertises en cherchant à potentialiser mes axes de recherche avec ces missions parallèles. Aussi ai-je appartenu à des commissions apparemment très différentes, mais qui avaient cependant toutes en commun l'expertise de produits biologiques et plus précisément des produits issus des biotechnologies.

# **PARTIE 1**

## **DES VIRUS ENTERIQUES AU NEMATODE PARASITE *TRICHINELLA*,**

**« LE VER QUI VOUDRAIT ETRE UN VIRUS »**

D DESPOMMIERS ■

## I Introduction

En fonction de mes différentes affectations ou mise à disposition le début de ma carrière scientifique se divise en deux parties successives.

La première porte sur l'étude de virus animaux : coronavirus entérique bovin (BCV), parvovirus canin 5, virus de la leucose féline. Le travail réalisé sur le BCV a été accompli à l'INRA de Thiverval Grignon (DEA) puis à l'INRA de Jouy en Josas (thèse). Les autres études virologiques ont été réalisées au LCRV devenu LERPAZ (AFSSA alfort). La première étude a été réalisée dans le cadre de mon stage de Maîtrise au LCRV et à l'issue de ma formation en virologie systématique à l'Institut Pasteur : je me suis intéressé dans le service de Madame Rémond (LCRV, Maisons Alfort) à la réplication du virus FeLV (feline Leukemia Virus). Ensuite je me suis impliqué dans le clonage du parvovirus canin pour une application diagnostique. Il m'a été demandé en 1993 de réaliser un changement thématique et de développer la biologie moléculaire en parasitologie au LCRV en rejoignant l'équipe de C Soulé qui a ainsi pu constituer l'unité Parasitologie. Le second thème de recherche que j'ai développé a donc eu pour thème le parasite *Trichinella*, thème d'étude qui a conduit à la création de l'UMR BIPAR.

En marge de cette activité de recherche j'ai eu en charge des missions à caractère administratif qui sont résumées dans l'annexe 1. Les missions « contrôle des produits biologiques vétérinaires » et « biosécurité/biotechnologie » ont conduit à un certain nombre de conférences ou publications techniques mentionnées.

## II Travaux déjà réalisés

### 1 Etude des virus animaux : des gènes à l'antigène

#### 1.1 Caractérisation des glycoprotéines et protéines non structurales du coronavirus entérique bovin (BCV).(Station de virologie de l'INRA de Thiverval Grignon puis de Jouy en Josas)

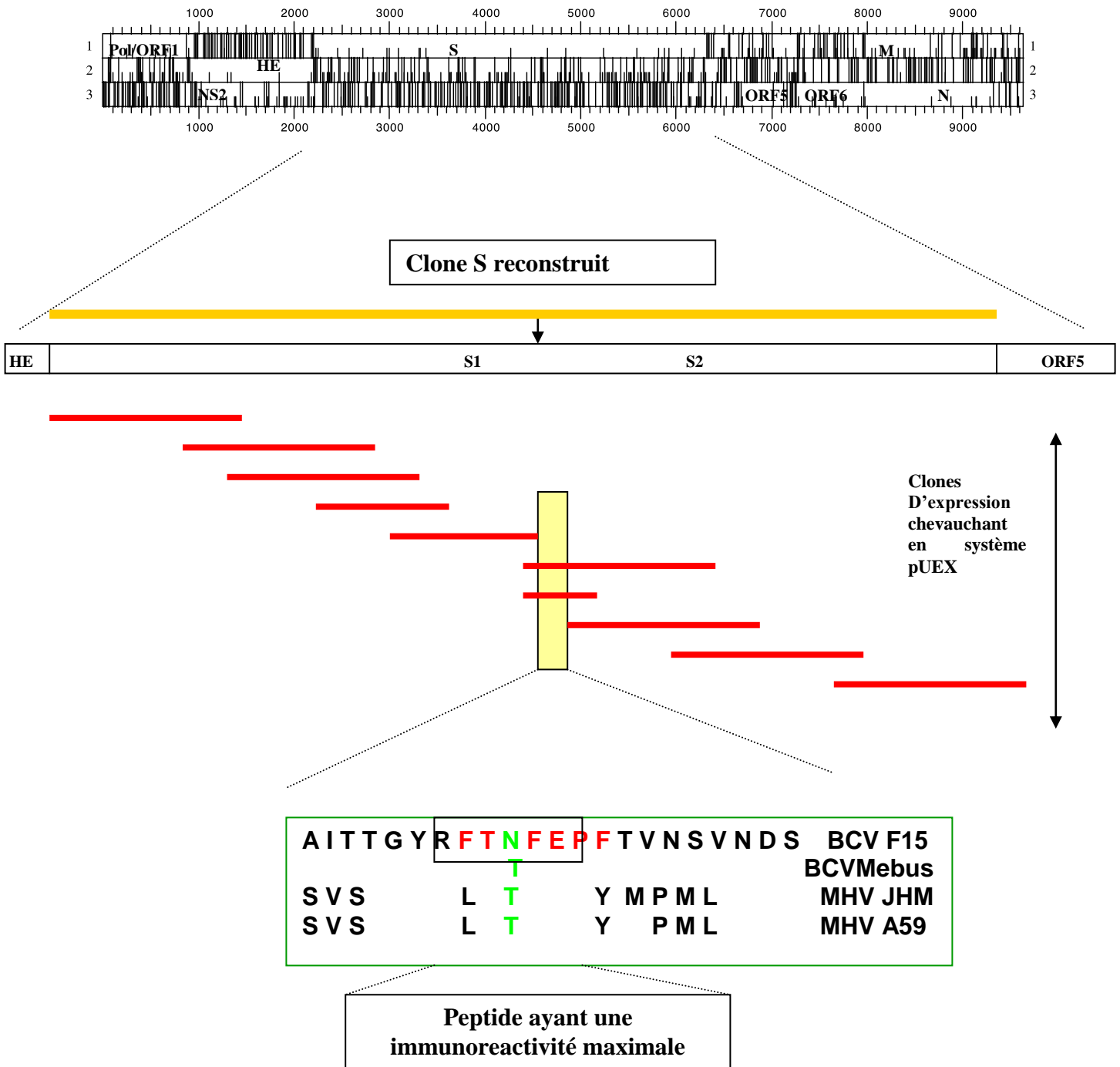
Lorsque j'ai débuté cette étude dans le cadre d'un DEA puis d'une thèse sous la direction de J Laporte à l'INRA de Thiverval Grignon (Station de virologie), les principaux travaux effectués sur le BCV avaient permis de caractériser les propriétés antigéniques des protéines structurales. Sept messagers viraux subgénomiques étaient identifiés et leur cinétique d'apparition était établie. Le gène N avait sa séquence nucléotidique déterminée pour la souche Mebus et la souche F15.

Nous nous sommes attachés à poursuivre et à préciser les particularités de la biologie du BCV par rapport aux autres coronavirus connus.

- Deux glycoprotéines, S et HE, caractérisent le BCV ; elles induisent des anticorps neutralisants (AcN) et ont un rôle important dans les premières étapes du cycle viral. La connaissance de la structure primaire de ces protéines apparaissait donc essentielle pour définir le lien entre ces protéines et l'induction d'une immunité protectrice, leur activité biologique (activité hémagglutinante, enzymatique) et le pouvoir infectieux du BCV ou plus généralement sa virulence. Pour affiner une approche qui, au départ, était essentiellement descriptive (clonage et détermination de la séquence nucléotidique), nous avons cherché à délimiter les épitopes linéaires de ces glycoprotéines en exprimant les gènes S ou HE à l'aide de vecteurs procaryotes comme cela avait été réalisé pour l'IBV (Lenstra et al., 1989) et le TGEV (Delmas et al., 1990). Cette approche constituait une étape nécessaire dans la préparation d'un vaccin recombinant utilisant des protéines synthétisées chez *E. coli* ou des antigènes de synthèse utiles dans la définition de systèmes de diagnostic. Nous avons également abordé le rôle de HE par rapport à celui de S en étudiant une interférence virale potentielle générée par HE exprimée dans des lignées permanentes.
- Une autre originalité du BCV est l'existence de 2 messagers viraux s'intercalant entre l'ARNm de S et celui de la polymérase. Ces messagers n'ont pas d'homologue chez le coronavirus aviaire (ou IBV) ou les coronavirus porcins (TGEV, CVRP). Nous nous sommes intéressés à définir quelle était la capacité codante de ces ARNm supplémentaires et pour quelles protéines codaient ces gènes.

Aussi avons-nous complété le clonage et la séquence nucléotidique du BCV du gène N jusqu'au gène de la polymérase (Figure 01). Cinq gènes ont ainsi pu être définis en aval de la polymérase: ORF<sub>2</sub> (NS<sub>2</sub>), HE, S, ORF<sub>4</sub>, ORF<sub>5</sub>. Plus de 6kb du gène de la polymérase virale ont été clonés et séquencés. L'expression de parties chevauchantes de la séquence codante du gène S en système procaryote a permis de localiser finement un épitope linéaire entre les acides aminés (aa) 775 et 791. Cet épitope (Figure 01) est **immunodominant** compte tenu de sa reconnaissance par différents sérums d'animaux hyperimmunisés ou naturellement infestés et cela quelque soit la méthode d'analyse utilisée (immunoprécipitation, technique de Western, ELISA). Il est nécessaire et suffisant pour le diagnostic de la coronavirose bovine. La fonction du produit de l'ORF<sub>2</sub> immédiatement adjacente au gène de la polymérase apparaissait bien différente de celle de S ou HE. Nous nous sommes intéressés à identifier le produit de ce gène (NS<sub>2</sub>) au cours du cycle viral. Plusieurs stratégies s'offraient à nous qui nous ont conduit à tester et utiliser différents vecteurs d'expression. Des anticorps polyclonaux spécifiques du peptide codé par cet ORF ont permis de déterminer la cinétique d'expression de cette protéine qui n'apparaissait pas incluse dans la particule virale.

➤ Valorisation : P1, P2, P3, P4, P5, P7, X1, M2, M3, C1, C2, C3, C5, C6, C7



**Figure 01 :** Cadres de lecture de la partie clonée et séquencée du BCV souche F15 ; Cartographie d'épitope de la glycoprotéine S du BCV.

Localisation des cadres ouverts de lecture de plus de 200 bases positionnés sur les 10 kb de la partie 3' du génome du BCV et dans les 3 phases de lecture 1, 2, 3 contenues dans le sens messager de l'ARN génomique. Les barres représentent un codon stop, les demi-barres un codon d'initiation. L'échelle est indiquée pour 1000 bases.

Représentation schématique des fragments chevauchants du gène S, exprimés chez *E. Coli*. La flèche positionnée sur le gène S du BCV indique la position du site de clivage de S (séquence en acides aminés (aa)) en S1 et S2. Les lignes horizontales inférieures rouges montrent les fragments de restriction fusionnés en phase avec le gène *cro lac z* du vecteur pUEX. Le cadre à fond jaune définit la région de S2 qui se lie avec les AcM du site S2A défini par JF Vautherot. Cette région s'étend entre les aa 779 à 850. L'analyse de nonapeptides chevauchant cette région a pu définir l'épitope minimal localisé sur 7 aa. La bonne conservation de l'immunoreactivité des AcM définissant ce site avec les différentes souches de BCV montre que l'aa N n'est pas essentiel dans l'immunorecognition.

## **1.2 Le parvovirus canin : diagnostic par hybridation moléculaire et identification d'un marqueur de souche vaccinal (LCRV, Maisons Alfort)**

A l'issue de mon travail de thèse j'ai rejoint l'équipe de M Rémond (unité de virologie du LCRV) pour réaliser un travail de clonage et séquençage du parvovirus canin. Le parvovirus canin comprend un génome de 5 kilobases simple brin qui code pour deux unités transcriptionnelles non chevauchantes. Lors de la réplication virale l'ADN génomique est converti en une forme répllicative double brin (RF). Des sites de restriction servent de marqueurs pour des virus inféodés à différentes espèces (McMaster et al, 1981) et la séquence nucléotidique du génome de parvovirus canins était décrite (Reed et al, 1988, Rhode, 1985). Le parvovirus canin est une maladie grave du jeune chiot avec une mortalité pouvant atteindre 80%. Les méthodes de prophylaxie médicales sont efficaces et ont permis d'enrayer la panzootie. Le but du travail développé visait à développer de nouvelles méthodes de diagnostic par hybridation moléculaire. Pour cela le fragment *EcoRI-PstI* des FR du génome de parvovirus canin (souche vaccinale dérivant du 114<sup>ème</sup> passages de la souche originale Carmichael) fut cloné et séquencé. Plusieurs clones obtenus présentaient une même délétion de 15 nucléotides et des mutations ponctuelles dans la partie 3' du gène NS1. La délétion caractérisée était le premier marqueur génomique d'une souche vaccinale de parvovirus canin utilisée en Europe.

Des sondes ADN ou ARN biotinylées obtenues à partir du fragment cloné se révélèrent aussi sensibles que les autres méthodes de diagnostic et permettaient de détecter au moins 3ng de génome viral ce qui était dans le même ordre de sensibilité que pour d'autres génomes viraux à ADN (herpesvirus, parvovirus humain souche B19..). Cette méthode présentait un avantage important par rapport à toutes les autres méthodes de diagnostic disponibles puisque la technique pouvait être utilisée à partir d'échantillons congelés.

La thématique virologie des carnivores ayant été arrêtée au CNEVA, le sujet n'a pas pu être poursuivi.

- Valorisation : P6, C4

## **2 *Trichinella* : de l'antigène aux gènes (LCRV devenu LERPAZ puis UMR BIPAR)**

Le développement de ce sujet au LCRV s'explique par mon affectation dans l'équipe de C Soulé qui avait développé de nombreux axes de recherche sur ce nématode parasite depuis plus de 10 ans et participait activement aux travaux de la Commission Internationale de la Trichinellose. C Soulé avait reproduit expérimentalement l'infestation du cheval par *Trichinella* et terminait un travail de typage par PCR des espèces de *Trichinella*.

### **2.1 Situation du sujet**

#### **2.1.1 L'infection par *T. spiralis* a une importance médicale et économique:**

La trichine a un impact en santé publique particulièrement marqué en France, Italie,

Chine, Mexique du fait des habitudes alimentaires et dans tous les pays où les contrôles sanitaires sont déstabilisés par des conflits ou rendus inefficaces du fait du sous équipement (Europe de l'Est). L'homme s'infeste le plus souvent à partir de viande de porc, de sanglier ou de carnivores infestés. Les récentes épidémies de trichinellose en France et Italie proviennent cependant de sources inhabituelles de transmission du pathogène (viande chevaline infestée) qui ont entraîné plusieurs centaines d'hospitalisation (Pozio, 1998, 2001) et qui rendent plus délicats les contrôles sanitaires compte tenu de l'adaptation du nématode à différents hôtes. Le taux d'infestation humaine dans le monde atteindrait 40 millions d'individus (Dupouy Camet, 2000). De ce fait, un contrôle des viandes à risque à l'abattoir et à l'importation est imposé dans beaucoup de pays. Le coût par porc abattu en Europe atteint 3 euros par animal; pour le cheval le dépistage systématique s'élève à 20 euros par animal abattu. Les anadémies humaines sont sporadiques mais régulières en France **et l'absence de diagnostic précoce** (avant 25 jours) conduit à un traitement symptomatique puisque le parasite une fois encapsulé est inaccessible aux anthelminthiques. Ces anadémies résultent de défaillance du **test officiel** de contrôle ou de sa mise en œuvre, d'où la nécessité d'améliorer ces contrôles.

### **2.1.2 L'infection par *T. spiralis* est un modèle d'étude en parasitologie :**

- Il existe une convergence étonnante du cycle de la Trichine avec celui d'un virus. Ce point explique en grande part ma motivation à développer un nouveau sujet sur ce thème: l'ensemble du cycle parasitaire se réalise chez un même hôte; le parasite est spécifique de tissu (cellule de l'épithélium intestinal et cellule musculaire striée); il se développe dans le cytoplasme de cellules hôtes et il induit une transformation de la cellule musculaire en cellule nourricière puis en kyste. *Trichinella* apparaît comme le seul parasite pluricellulaire de mammifère se développant dans un environnement intra-cellulaire.
- *Trichinella* est spécifique de tissu et ne présente que peu de restriction d'hôte car tous les mammifères peuvent être infestés. Il n'a d'égal à ce titre que *Toxoplasma*.
- La résistance de ce parasite pluricellulaire au sein de sa cellule hôte est étonnante puisqu'il persiste plusieurs semaines à des températures de 50°C pour l'espèce *T nelsoni* ou plusieurs années à -30°C pour *T nativa*.

*Ces caractéristiques uniques de développement et de résistance font de ce parasite un modèle tout à fait particulier dans la relation hôte-parasite et l'étude de l'immunité locale intestinale qui sera développée lors de la création de l'UMR BIPAR.*

### **2.1.3 Les questions auxquelles je me suis attaché à répondre au cours des recherches menées:**

- Comment un parasite réalisant tous ses stades chez un même hôte peut-il échapper aux défenses immunitaires?
- Qu'est-ce qu'une réaction immunitaire protectrice vis-à-vis de *Trichinella* et quel est son sens pour la vie du parasite qui demeure dans l'hôte?
- Quels sont les gènes codant pour les protéines impliquées dans la protection de

l'hôte?

- Quels sont les mécanismes de résistance aux conditions extrêmes du parasite et impliqués dans la virulence? <sup>1</sup>
- Quels sont les gènes impliqués dans la pénétration/transformation de la cellule hôte?

La réponse à ces questions permet d'envisager des impacts plus généraux en helminthologie notamment dans l'étude de la réponse protectrice de la muqueuse vis à vis des helminthiases des ruminants.

## 2.2 Objectifs

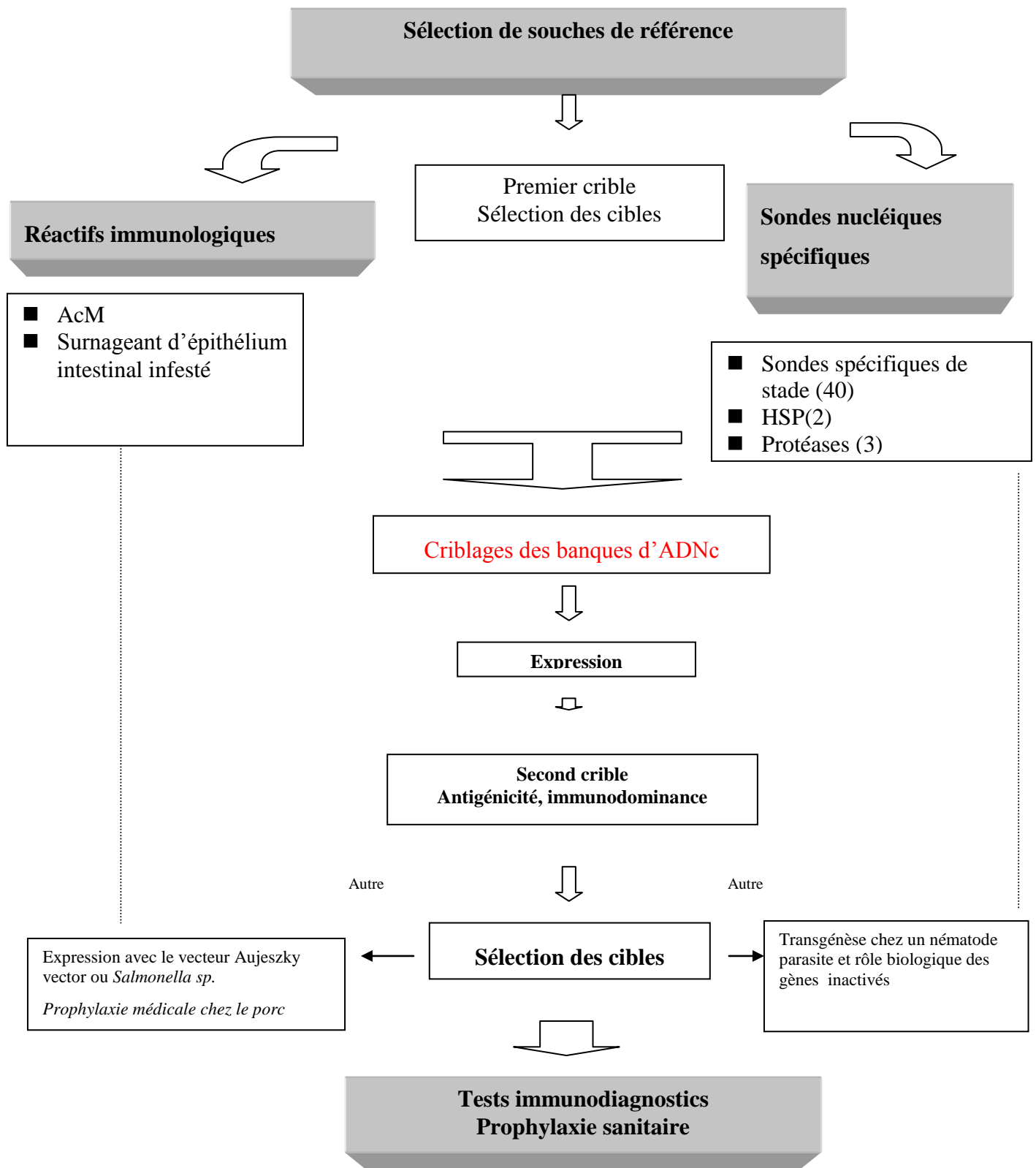
Ils visaient à connaître les antigènes de *Trichinella* impliqués dans l'immunodominance avec pour but l'amélioration du diagnostic sérologique et la détermination d'épitopes critiques dans la réaction immunitaire protectrice (Figure 02). Pour cela deux voies s'offraient à nous.

La première consistait à réaliser une carte d'antigènes de *Trichinella* des différents stades parasitaires à l'aide des anticorps monoclonaux obtenus vis-à-vis de ces différents stades. Cette approche reprenait en plus macroscopique ce que nous avons fait avec JF Vautherot sur la glycoprotéine S du BCV.

La seconde voie consistait à sélectionner des gènes choisis pour leur importance dans les fonctions vitales du parasite et à vérifier leur antigénicité. Trois familles ont été sélectionnées : les protéines de choc thermique qui sont immunodominantes chez de nombreux parasites, les protéases dont le rôle clé dans de nombreuses fonctions vitales a été largement étudiés chez beaucoup de pathogènes et enfin les P glycoprotéines, protéines transmembranaires décrites chez *C. elegans* comme intervenant directement dans la résistance aux toxiques. Cet intérêt pour l'étude de gènes conservés a été complété par la sélection de gènes spécifiques de stade (Figure 02).

---

<sup>1</sup> La réponse à cette question n'a pas été apportée au cours des recherches menées mais le problème demeure et les outils développés par ailleurs permettent de le résoudre en partie.



**Figure 02** : Stratégie générale de sélection de gènes d'intérêt pour la prophylaxie médicale et sanitaire de *Trichinella*.

### 2.3. Définition des stades antigéniques de *Trichinella*

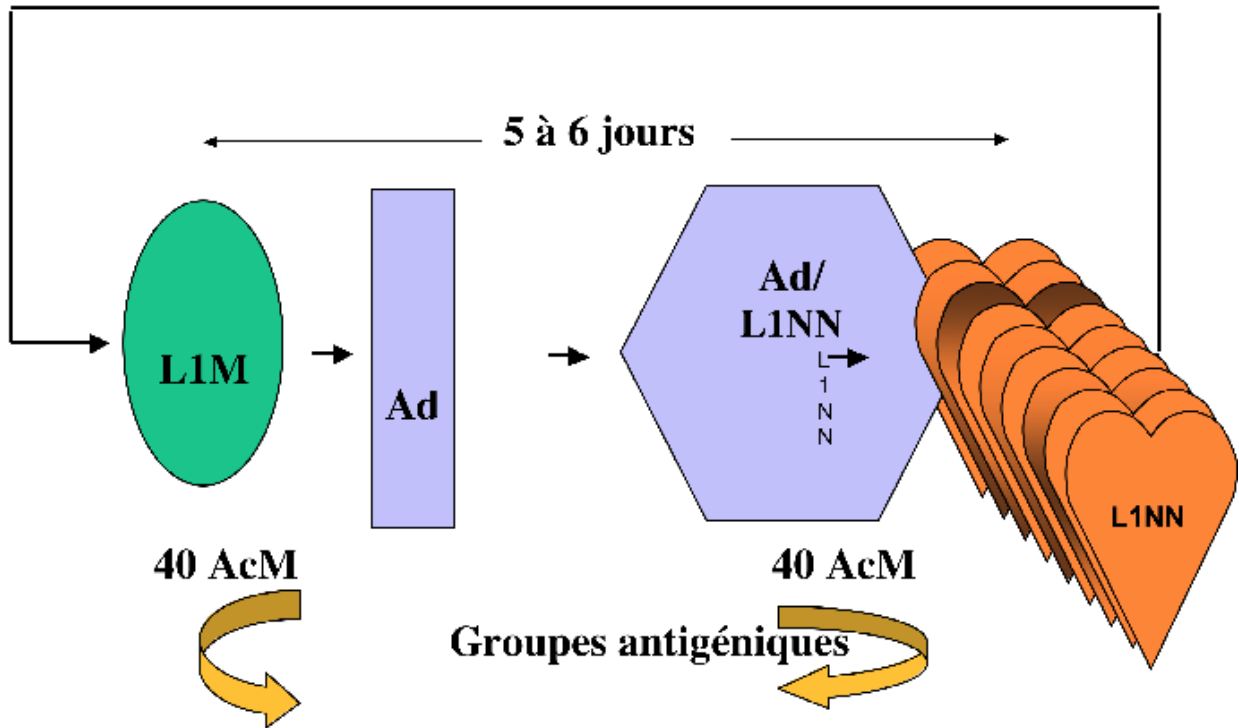
Le cycle monoxène de *Trichinella* implique la présence de tous les stades parasites chez un même hôte. Le stade L1M a été défini comme la forme infectieuse du parasite après maturation de la cellule nourricière (au moins 35 jours chez la souris, moins chez le porc). Ce stade a été à l'origine de la majeure partie des études portant sur *Trichinella*. RM. Parkhouse a initié l'étude d'autres stades dès 1984 avec la sélection d'AcM reconnaissant le stade adulte et L1NN (Parkhouse et Ortega-Pierres, 1984) mais ses travaux ont été peu suivis<sup>2</sup>. Nous avons continué dans cette direction en 1993 en définissant dans un premier temps ce que nous pouvions considérer comme étant un stade Adulte du parasite pure de toute larve L1M (mue accomplie) et de larve L1NN. F LeGuerhier a défini le stade Adulte et a mis au point une méthode de purification au cours de son DEA. Le stade adulte est le parasite purifié à partir de l'intestin moyen de la souris 3 jours après l'infestation (pour toutes les espèces de *Trichinella*). Ce stade se caractérise par l'absence d'émission de L1NN dans le surnageant de culture cellulaire pendant 48h lorsque l'on place le parasite purifié dans ce milieu de survie et par l'absence de développement de L1NN dans l'utérus des femelles. Liu Mingyuan dans le cadre d'un post doctorat au laboratoire a montré que les L1NN sont émises aux jours 4 (*T spiralis*) et 5 (autres espèces) à partir des adultes purifiées de l'intestin de souris infestées. Une méthode de purification des L1NN a également été mise au point. Ces études nous ont permis de décrire différents stades collectés dans des conditions standard (Figure 03) : le stade L1M (après 35 jours chez la souris), le stade Adulte, le stade L1NN prélevé 48h après la mise en survie des adultes « purifiés » 4/5j après l'infestation. La difficulté de produire en grande quantité les L1NN m'a conduit à étudier plus globalement le stade Adulte/L1NN (Ad/L1NN) en tenant compte du développement ovovivipare de *Trichinella* et de l'intérêt potentiel des antigènes libérés lors de l'expulsion des L1NN. La définition précise de ces stades parasites a servi de fondement aux travaux suivant.

- Valorisation : P19, X4, C14, C18, S2, S3, S4

---

<sup>2</sup> RM Parkhouse avait initié ce travail sur les antigènes de stade avec G Ortega Pierres qui réalisait sa thèse dans son unité. La collaboration avec le CINVESTAV de Mexico que j'ai initiée en 1996 avec G Ortega Pierres portait sur la sélection des gènes spécifiques codant pour le stade adulte de *Trichinella*. RM Parkhouse avait « abandonné » *Trichinella* en 1986 au profit d'autres parasites puis du virus de la peste porcine africaine. Ses études avaient été peu suivies après l'arrêt de ses travaux en partie du fait de l'émergence de la trichinellose équine qui a conduit à une concentration des efforts de recherche dans ce domaine. En 1999 nous avons pu recruter au laboratoire I Vallée en tant que CR2 sur un profil « immunologie parasitaire » alors qu'elle terminait son post doctorat dans le laboratoire de RM Parkhouse.

Figure 03: Stades antigéniques de *Trichinella* dans le tube digestif de son hôte  
L1M : larve musculaire, Ad : stade Adulte du parasite ; L1NN : stade L1 nouveau née du parasite. AcM : Anticorps monoclonaux



## 2.4 Cartographie des antigènes de *Trichinella* :

### 2.4.1 Stade L1M:

À l'instar de ce que nous avons réalisé avec JF Vautherot sur la protéine S du BCV, j'ai préparé une banque d'anticorps monoclonaux vis-à-vis du stade L1M en partant du principe que :

1 Les autres AcM anti *Trichinella* décrits n'avaient été analysés qu'à l'aide d'une technique dénaturante signifiant que tous les épitopes conformés dans l'espace n'avaient pas été analysés.

2 Le principe de l'immunisation pour produire ces AcM décrits par ailleurs avait toujours été une voie générale induisant une dilution conséquente des cellules productrices d'Ac spécifiques et une réduction du répertoire.

J'ai réalisé cette banque d'AcM en utilisant la voie locale (injection intra plantaire) et la collecte du nœud lymphatique poplité de la souris. Les deux espèces de *Trichinella* responsables des récentes épidémies humaines en France ont été utilisées à leur stade L1M comme source d'antigène immunisant. Plus de 100 hybridomes spécifiques du stade L1M ont été sélectionnés par la technique d'immunofluorescence sur cryocoupes afin de dénaturer le moins possible les antigènes conformés. À partir de ce premier criblage 40 AcM produits par des lignées stables ont été analysés finement et ont été classifiés en fonction de la localisation anatomique de l'épitope reconnu. Avec M Vayssier réalisant sa Thèse au laboratoire nous avons défini 11 groupes antigéniques à partir des couches cuticulaires les plus périphériques jusqu'aux organes profonds. Six groupes antigéniques ont été présents au seul niveau de la cuticule montrant ainsi une complexité inattendue de cet organe au niveau de sa structure visualisée sur les cryocoupes et de son antigénicité. Les précédents groupes antigéniques décrits par d'autres auteurs appartenaient aux groupes 5 et 6 que nous avons définis. Ces AcM ont été testés vis-à-vis d'un autre stade antigénique (Adulte) de *Trichinella* et différentes espèces pour le stade L1M (5 espèces). Des AcM montrent des différences entre les espèces *T spiralis* et *T nelsoni* ou *T nativa*. Un pool de 8 AcM permet de différencier les 5 principales espèces de Trichine par immunofluorescence indirecte (IFI). La méthode de transfert sur membrane utilisant un antigène dénaturé, nous a permis d'obtenir une sensibilité équivalente à celle de la PCR avec les AcM du groupe 5. Par ailleurs, la présence de deux espèces de *Trichinella* dans un même échantillon peut être détectée grâce à ces AcM, et est utile pour le dépistage d'infestations mixtes.

En résumé, la complexité de la structure de la cuticule de *Trichinella* a été montrée. Les couches les plus périphériques de la cuticule portent les épitopes spécifiques de stade et d'espèce. Ils sont hautement sensibles à la dénaturation.

➤ Valorisation : P9, P8, X5, C8, C9, C15, C19, C35,

### 2.4.2 Stade Adulte/L1NN

Un certain nombre d'études montre le rôle clé des stades L1NN et Adulte dans l'induction d'une réponse immune protectrice (Marti et al, 1987). De la même façon que pour le stade L1M, j'ai cherché à identifier les épitopes conservés immuno-dominants pour ces 2 stades. Cette étude s'est accomplie sur le modèle souris.

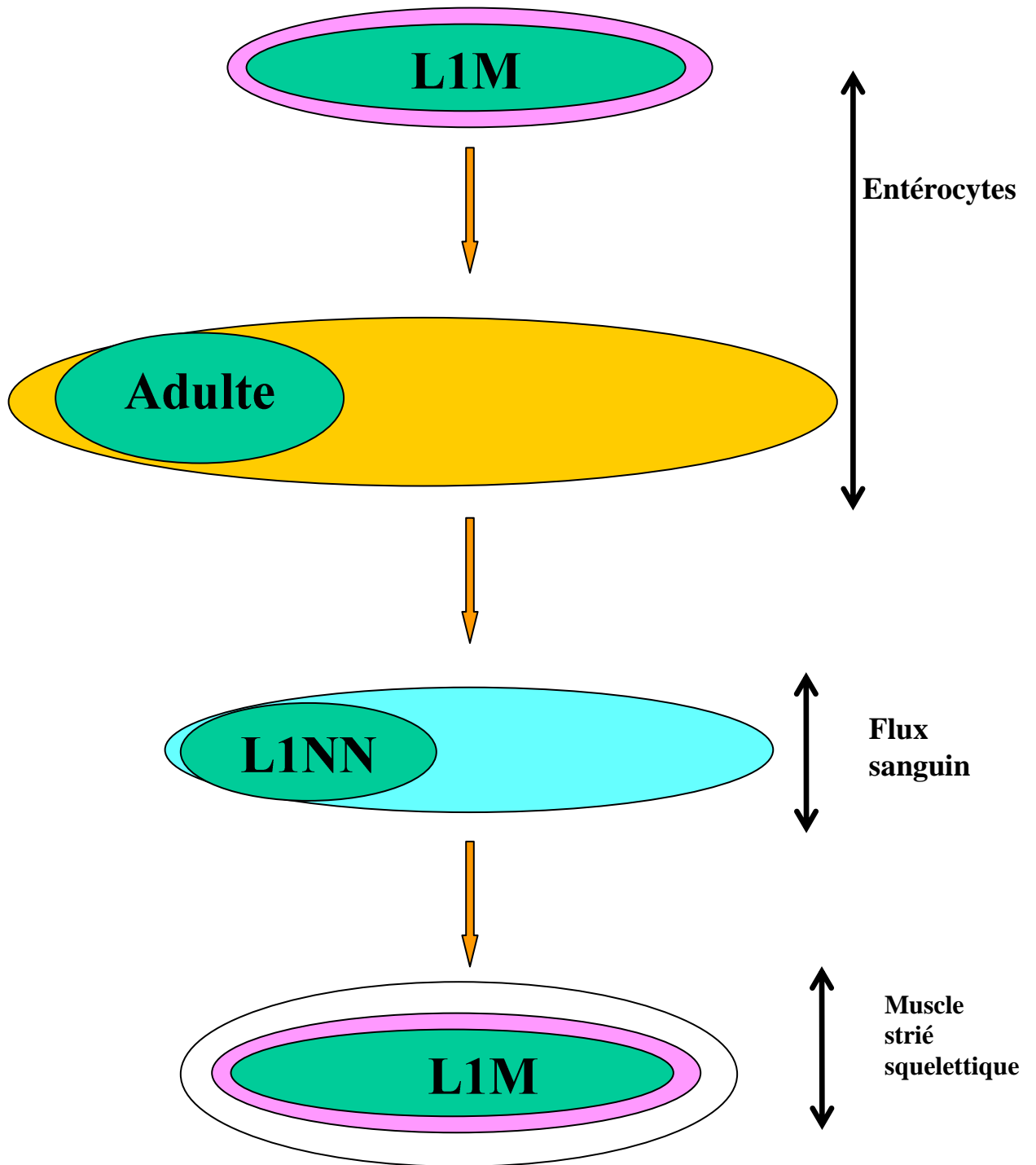
Des AcM spécifiques du stade Ad/L1NN ont été préparés après une immunisation comme décrit précédemment. Des cellules productrices d'IgG ou IgM ont été sélectionnées. Plus de 60 lignées d'hybridome ont été obtenues sécrétant des Ac reconnaissant par IFI des épitopes sur des cryocoupes de *Trichinella* (Stade Ad/L1NN).

La suite du travail a été effectuée avec 40 lignées d'hybridome et la classification des épitopes a été réalisée comme pour le stade L1M. Neuf groupes antigéniques ont été définis pour le seul stade L1NN. Les épitopes spécifiques de stade appartiennent au groupe 1 qui est, comme pour le stade L1M le plus périphérique et externe de la cuticule. Trois groupes sont strictement cuticulaires, les autres groupes reconnaissent des organes profonds ou des éléments sub-cellulaires (noyau..). Une comparaison a été faite entre différents nématodes (*Meloidogyne*, *Steirnerema*, *Trichonema*, *C elegans*) en utilisant les 40 AcM sélectionnés et caractérisés. Seul le groupe antigénique 9 défini pour le stade L1NN présente une réactivité croisée avec d'autres nématodes.

Ces AcM permettent de sélectionner des marqueurs des larves circulantes puisque le groupe 1 reconnaît spécifiquement un épitope très labile. Cette caractéristique explique les difficultés techniques de purification de cet épitope rencontrées par l'équipe Mexicaine avec qui nous avons une collaboration dans le cadre d'une action ECOS (cf coopération internationale). Ces AcM ont permis de déterminer un véritable linéage d'épitopes du stade L1NN au stade Adulte pour les groupe 2 à 9 du stade L1NN. La localisation de certains organes du stade L1NN dont l'anatomie était complètement ignorée a ainsi pu être précisée (exemple du stichosome présent au stade L1NN).

Des épitopes critiques de *Trichinella* ont ainsi pu être mis en évidence: plusieurs groupes antigéniques spécifiques de stade ont été identifiés avec des AcM. Leur expression fugace chez l'hôte suggère un mécanisme d'échappement au système immunitaire ou de masquage d'antigènes critiques (Figure 04). Les AcM reconnaissant de telles cibles pourront être testés *in vivo* et *in vitro* pour étudier leur rôle biologique grâce au modèle *ex vivo* développé par I Vallée, CR2 recrutée au laboratoire sur la thématique immunité muqueuse et *Trichinella* (cf Projet de recherche de l'unité BIPAR).

- Valorisation : X6, C35, C24, S4-S8



**Figure 04 :** Flux des antigènes périphériques de *Trichinella* pour différents stades parasitaires. Proposition d'un mécanisme d'échappement. Chacune des couleurs périphériques représente au moins une couche épicuticulaire disparaissant au stade suivant. La cellule nourricière représente une nouvelle couche périphérique propre à l'hôte.

## **2.5 Gènes conservés et gènes spécifiques de stade.**

La seconde stratégie du travail (Figure 02) pour sélectionner des antigènes immunodominants revenait à identifier des gènes d'intérêt parmi le pool potentiel de 10-12000 gènes portés par le génome de *Trichinella*. J'ai proposé un double crible pour atteindre cet objectif (Figure 02):

- La sélection et l'utilisation de sondes spécifiques de gènes d'intérêt
- La sélection de sonde spécifique de stade, le séquençage et la sélection secondaire après analyse de la séquence en aa déduite des motifs enzymatiques type protéase, des glycoprotéines, des éléments potentiellement structuraux du parasite.

Auparavant il était nécessaire de valider et justifier l'utilisation de telle ou telle banques d'ADNc.

### **2.5.1 Établissement des banques d'ADNc**

Des banques d'ADNc de tous les stades parasitaires précédemment définis (Adulte, Adulte/ L1NN, L1M) et de la plupart des espèces (stade L1M au moins) ont été réalisées avec des étudiants en thèse, post-doctorants, en stage de BTS ou de maîtrise (Tableaux 01, 02). Nous avons montré la plus forte transcription aux stades Ad et L1NN avec des teneurs en ARNm proches de 1% (Tableau 02) et avons décrit la cinétique d'expression de certains gènes connus (p49, p53, p46). Ces trois gènes clonés par d'autres équipes ne sont pas exprimés chez une espèce de trichine et à certains stades invasifs. De ce fait les produits de ces gènes ne seront pas utilisés dans l'étude de la réaction immunitaire locale puisqu'ils ne sont pas immunodominants au sens où nous l'avons défini précédemment pour l'épitope de la glycoprotéine S du BCV.

### **2.5.2 Validation des banques d'ADNc construites**

Une structure clonale et un flux génique limité dans le genre *Trichinella* est suspecté compte tenu du mode de reproduction du parasite (croisement frère x sœur important génération après génération). La corrélation établie entre différentes séries de marqueurs génétiques (marqueur PCR, isozymes, anticorps monoclonaux) permet d'établir un même arbre phylogénétique pour les différentes espèces de Trichine (Bandi et al, 1995,). Selon les travaux de Tibayrenc et al (1990) réalisé chez différents protozoaires la correspondance des arbres phylogénétiques d'un parasite pour différents marqueurs prouve une forte homozygotie allélique.

<b>GENOTYPE/ index</b>	<b>PHENOTYPE</b>	<b>ESPECE HOTE</b>	<b>ORIGINE</b>	<b>STADE</b>
T.T1/0	<i>Trichinella spiralis</i> ISS534	Porc	Chine	L1NN
T. T1/1	<i>Trichinella spiralis</i> ISS534	Porc	Chine	Adulte
T. T1/2	<i>Trichinella spiralis</i> ISS534	Porc	Chine	Adulte / L1NN
T. T1/3	<i>Trichinella spiralis</i> ISS534	Porc	Chine	L1M
T. T1/4	<i>Trichinella spiralis</i> ISS406	Chat	France	Adulte
T. T1/5	<i>Trichinella spiralis</i> ISS406	Chat	France	Adulte / L1NN
T. T1/6	<i>Trichinella spiralis</i> ISS406	Chat	France	L1M
T. T4/7	<i>Trichinella pseudospiralis</i>	Raton laveur	Suisse	L1M
T. T2/8	<i>Trichinella nativa</i> ISS532	Chien	Chine	L1M
T. T2/9	<i>Trichinella nativa</i> ISS532	Chien	Chine	Adulte / L1NN
T. T2/10	<i>Trichinella nativa</i> ISS44	Renard polaire	Canada	L1M
T. T3/11	<i>Trichinella britovi</i> ISS137	Renard	France	Adulte
T. T3/12	<i>Trichinella britovi</i> ISS137	Renard	France	Adulte / L1NN
T. T3/13	<i>Trichinella britovi</i> ISS137	Renard	France	L1M
T. T7/14	<i>Trichinella nelsoni</i> ISS37	Phacochère	Tanzanie	L1M

**Tableau I** : Référence des espèces de *Trichinella* utilisées pour établir des banques d'ADNc.

Etudiants /Contrat recherche	Génotype index	ARN /ARNm/ ADNc (ug)	Nombre ligatures/ encapsidations	Titre banque initiale X 10 <sup>6</sup> /ml (% de clones négatifs)	Titre final banque amplifiée X 10 <sup>10</sup> /ml	Références
Fu Baoquan /CEIS	T.T1/0	256/3,8 /0,45	2/7	1,2	3,6	Brevet en cours
Liu Mingyuan /AFCRST	T. T1/1	1100/14/	2/2	2,2	0,2	P19
Karine Sauzeau	T. T1/2	420/4/0,326	4/4	1,115(2%)	0,42	P19
LI Chengyao /CEIS	T. T1/3	1383/10,8/125	2/2	2,69	0,7	P19
Patricia Garcia /ECOS	T. T1/4	1100/7/225	2/2	0,45(2,8%)	1,1	P19
Francis Foata	T. T1/5	187/2,5/0,633	2/3	1,44(1%)	0,2	
Catherine Trap /bourse CNEVA	T. T1/6	1000/6/0,300	2/3	0,9	9,8	DEA, Thèse, X4
Catherine Trap /bourse CNEVA	T. T4/7	500/4/0,900	2/3	3	1,6	DEA,
Li Chengyao /CEIS	T. T2/8	400/3	2	2	1	P19
Karine Sauzeau	T. T2/9	250/2/0,198	2/2	1,75(0,7%)	0,5	P19
Francis Foata	T. T2/10	812/6,25/0,5	2/3	1,96 (1,5%)	0,5	
Franc Le Guerhier /Bourse MNRT	T. T3/11	780/4,56/0,2	2/7	0,78(1,9%)	0,03	P12, X4
Catherine Trap /Bourse CNEVA	T. T3/12	120/2,5/0,216	3	2,5	4,3	DEA,
Muriel Vayssier Bourse CNEVA	T. T3/13	1500/4,5/0,4	4/8	0,8	1	Thèse, P12 , X3
David Laurent	T. T7/14	1250/3,75/0,660	2/3	1,47(4,75%)	1,75	

**Tableau 02: Banques d'ADNc établies au laboratoire. Les étudiants ayant été directement impliqués dans l'obtention de ces banques d'ADNc sont mentionnés ainsi que les articles ou rapports publiés décrivant certaines de ces banques.**

Nous avons conforté cette hypothèse avec Liu Mingyuan en réalisant plus de 200 amplifications aléatoires sur différentes banques d'ADNc de différentes espèces de trichines ou différents isolats d'une même espèce. Deux oligonucléotides ont permis de sélectionner des bandes surnuméraires venant de deux populations différentes de la même espèce. Le clonage de la bande surnuméraire la plus intense amplifiée a permis de sélectionner un gène qui présentait un changement nucléotidique sans altération du cadre de lecture pour les deux isolats de la même espèce. Le grand nombre d'amplifications aléatoires réalisé permet cependant de conforter la forte « clonalité » dans le genre *Trichinella*, « clonalité » déjà suggérée lors de l'étude avec les AcM.

Les banques d'ADNc d'espèce et de stade que j'ai établies avec différents étudiants (Tableaux 01, 02) peuvent donc être utilisées comme représentatives de chacune des espèces étudiées et non pas d'un individu ou d'une population.

➤ Valorisation : P19, P12, X4

### **2.5.3 Rôle des familles de gènes conservés dans l'immunité protectrice et la virulence**

#### *a Rôle des protéines de choc thermique (HSP) dans la relation hôte – parasite*

Le développement extraordinairement rapide entre le stade L1 infectieux et le stade L1NN invasif met en jeu une régulation puissante pouvant faire intervenir les protéines de stress HSP, généralement immunodominantes chez les parasites (Skeiky et al., 1995). Par ailleurs, compte tenu du rôle de l'HSP 70 humaine dans la dystrophie musculaire (Régulation de la protéine myoD), de l'implication de certaines HSP dans le développement d'organisme (HSP27 en particulier) il m'est apparu nécessaire d'étudier le rôle de ces HSP dans le développement de *Trichinella* et dans les changements de stade. L'essentiel de ce travail a fait l'objet de la thèse de Muriel Vayssier avec qui j'ai mis au point la méthode d'extraction des ARNm de *Trichinella*.

L'ADN complémentaire des ARNm purifiés de *T britovi* a été utilisé dans une réaction d'amplification en chaîne par polymérase pour obtenir une sonde homologue à l'aide d'oligonucléotides dégénérés obtenus à partir de motifs conservés des protéines HSP70. Les différents clones sélectionnés nous ont permis de déterminer la séquence nucléotidique d'une protéine HSP70 cytoplasmique de *T britovi*. Un gène homologue pour l'espèce *T.pseudospiralis* a pu être séquencé.

L'expression du gène HSP 70 de *T britovi in vitro* et dans un système procaryote nous a permis de démontrer son antigénicité chez plusieurs hôtes. La partie du gène HSP exprimée chez *E. coli* n'induit cependant pas de protection chez la souris. Un sérum polyclonal spécifique de l'HSP70 de *T britovi* a permis de localiser l'expression de cette protéine dans les noyaux des cellules parasites du seul stade L1M montrant ainsi une différence de localisation en fonction des stades.

➤ Valorisation : P12, X3, C10, C11, C13, C17

### *b Essai de clonage des gènes des p-Glycoprotéines (pGP) de Trichinella*

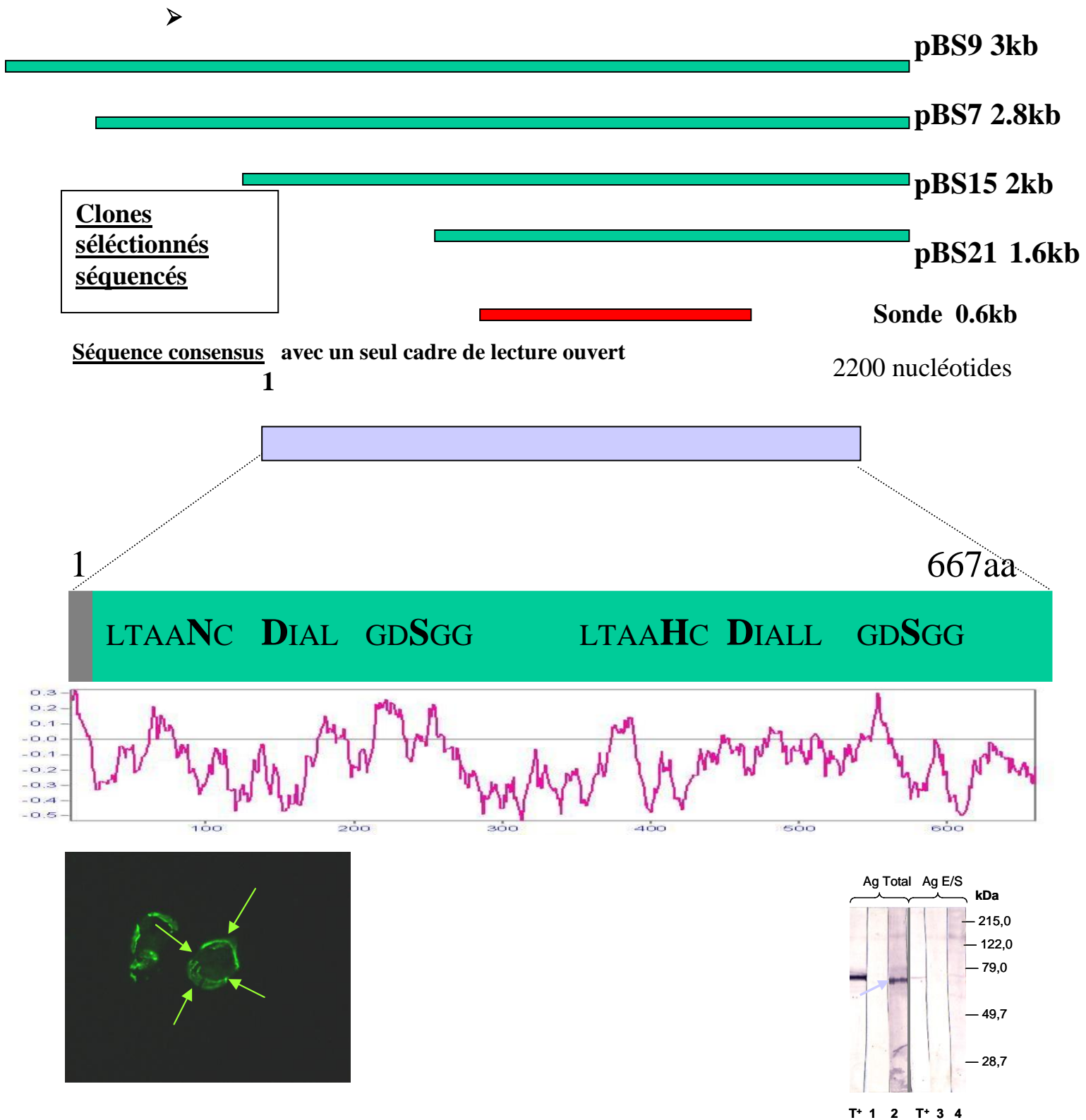
Les p-GP sont des protéines impliquées dans la détoxification et la protection cellulaire. Ces protéines assurent pour certains nématodes le rejet des anti-parasitaires ou de diverses toxines issues de l'environnement dans le tube digestif pour permettre son élimination. Il importait donc de caractériser pour *Trichinella* ces protéines qui ont une importance pour la défense non spécifique des parasites aux agressions biochimiques. Aucune de ces protéines n'avait encore été identifiée chez ce parasite. Différentes stratégies ont été développées avec V Niborski dans le cadre de son DEA. L'utilisation d'amorces dégénérées obtenues par alignement des sites conservés des pGP d'autres organismes n'a cependant pas abouti, des ADNc différents de ceux codant pour une pGP ont toujours été reconnus.

➤ Valorisation : C26

### *c Caractérisation d'une protéase à sérine de Trichinella spiralis. (AF331156)*

Ce travail a fait l'objet de la thèse de Catherine Trap. Les gènes codant pour des protéases constituaient la 3<sup>ème</sup> famille de gènes conservés que nous avons sélectionnée dans le premier crible (Figure 02). A l'aide d'oligonucléotides dégénérés spécifiques de séquences conservées de protéases, (Harrop et al, 1995), un fragment d'ADN de 610pb a été amplifié par la technique de PCR à partir d'ADNc du stade adulte-L1NN de *Trichinella spiralis* (ISS 534). Le fragment de 610pb a également été amplifié à partir des banques plasmidiques d'ADNc du stade adulte-L1NN de souches chinoise et française de *Ts*.

La sonde ainsi obtenue a été clonée dans le vecteur pCR II Topo, puis séquençée. La séquence nucléique a été effectuée et la séquence en acides aminés déduite a été comparée à un grand nombre de séquences protéiques regroupées dans des bases de données (collaboration avec H. Philippe, Université Paris-Sud Laboratoire de Biologie Cellulaire). L'analyse de la séquence a montré que le fragment d'ADN amplifié est une partie d'un gène codant pour une protéase à sérine de la famille des trypsines. L'expression du gène codant pour la protéase à sérine a été analysée aux trois stades antigéniques de *Ts* par la technique de transfert sur membrane. Le niveau d'expression du transcrit est légèrement supérieur au stade adulte par rapport au stade musculaire. Par contre, l'autoradiographie du stade L1M J+26 pi, ne montre qu'un très faible niveau d'expression du gène de la sérine protéase, alors que les quantités d'ARN déposées à ce stade étaient bien plus élevées (bande détectable pour 40µg d'ARN utilisés) que celles des autres stades. Cette variation d'expression du gène au cours du stade musculaire suggère que l'enzyme présente une régulation au cours de la morphogenèse de la cellule nourricière de *Trichinella*. La séquence nucléotidique a été obtenue à partir de 6 clones indépendants (Figure 05) et à montrer l'existence d'un cadre de lecture unique. L'analyse de la séquence en aa déduite nous a permis de montrer l'existence de deux domaines indépendants portant un site actif différent d'une protéase à sérine. Le premier domaine (alpha) présente une différence au niveau d'un des aa de la triade catalytique par rapport au second domaine (béta) (Figure 05). C'est la première protéase parasite ayant deux domaines catalytiques ne résultant pas d'une simple duplication.



**Figure 05 :** Caractérisation d'une protéase à sérine à double site actif de *Trichinella*. Les clones utilisés pour le séquençage sont en vert (pBSx). La sonde ayant servi au criblage est en rouge. La séquence déduite en aa montre la présence de deux domaines comparables mais n'appartenant pas à un même domaine dupliqué. Le profil d'hydrophobicité est indiqué en rose et montre l'existence d'un peptide signal. La protéase mature exprimée à tous les stades a une taille de 72kDa et est localisée sur une couche cuticulaire (groupe LIM précédemment défini).

Le domaine bêta a été partiellement exprimé dans *E coli* sous forme de corps d'inclusions. Du fait de son caractère insoluble, la molécule a été purifiée en conditions dénaturantes sur colonnes de Ni-NTA. L'obtention d'un sérum polyclonal monospécifique vis-à-vis de cette protéase à sérine nous a permis de localiser cette enzyme à la périphérie du parasite (localisation équivalente au groupe 3 L1M) suggérant une action éventuelle dans la mue du parasite.

➤ Valorisation :P14, C28, C30, C37, C42

#### *d Caractérisation du gène de la Myosine (AF331157)*

Compte tenu du rôle de la myosine dans la virulence des protozoaires parasites (constituant majeur du cytosquelette) tels que *Toxoplasma gondii* ou *Entamoeba histolytica*, nous avons décidé d'analyser le gène codant pour cette protéine chez *Trichinella* (Thèse de Catherine Trap)

Le gène de la chaîne légère I de la myosine de *Trichinella* comprend 1010pb, (36% A, 30% T, 18% C et 16% G) avec un cadre de lecture ouvert de 529 pb et le premier codon d'initiation ATG en position +1, défini par la présence d'une purine (A) en -3 et d'un C en position -1 (Kozak, 1987). La région 5' non codante est constituée de 35pb. La taille du transcrit, 0,99Kb, sans la queue poly(A) est en accord avec les résultats obtenus par la technique de transfert de Northern. Le pourcentage de guanine/cytosine du gène est de 34%, similaire au GC% (35%) obtenu par Hammond et Bianco (1992), sur l'ensemble du génome de *Trichinella*. L'intérêt majeur de l'analyse de la séquence codante de la myosine réside dans l'élaboration d'un arbre phylogénétique permettant de rapprocher le groupe des nématodes vers l'embranchement des arthropodes.

#### **2.5.4 Établissement de sous banques spécifiques de stade pour *Trichinella spiralis***

Des sous banques spécifiques des stades Ad, L1NN et L1M ont été établies par P Garcia Reyna et Li Chengyao au laboratoire dans le cadre d'un contrat ECOS (responsable mexicain G Ortega Pierres) avec le CINVESTAV de Mexico et d'un contrat AFCRST (responsable chinois Liu Mingyuan) avec l'université de Changchun. Pour cela différentes stratégies ont été opérées.

De l'ARNm a été purifié pour établir certaines banques et sondes. En revanche pour le stade Ad-L1NN une transcription *in vitro* a été opérée pour produire les ARNm. Les banques soustractives suivantes ont été obtenues:

T1 : adult-L1M

T2 : L1M -adult (inverse de la précédente)

T3 : (Ad-L1NN) -adult+L1M

T4 : (Ad-L1NN)-L1M

La pureté des banques soustractives a été vérifiée en hybridant chacune de ces deux banques avec la sonde spécifique et totale du stade L1M. Plus de 60% des clones étaient spécifiques de stade. Il a été montré que le pourcentage d'ARNm spécifiquement exprimé aux stades Ad et L1NN était inférieur à 2% confirmant ainsi les résultats obtenus avec les AcM (moins de 2% d'AcM spécifiques de stades ont été sélectionnés). Il apparaît que chacun des trois stades antigéniques est défini par un petit nombre d'ARNm de l'ordre de 100 ou 200 molécules.

Plus d'une trentaine de clones (sur 60 obtenus) ont été analysés par Fu Baoquan

dans le cadre de sa thèse et Liu Mingyuan pendant 2 stages post-doctoraux de 6 mois dans l'unité (séquençage, analyse des séquences, expression chez *E coli*). Trois gènes ont pu être reconstruits dont deux sont spécifiquement exprimés au stade Ad et/ou L1NN.

- un gène codant pour une protéase à sérine de *Trichinella*. Sa reconstruction a été réalisée. Une hybridation d'un ARN de 1800 pb apparaît au stade adulte/L1NN correspondant au transcrit de cette enzyme présentant un signal peptide et devant être sécrété. Aucune hybridation n'a eu lieu avec les ARN du stade musculaire bien que des concentrations très élevées en ARN<sub>T</sub> (jusqu'à 100µg) aient été déposées sur le gel de migration. Son expression est bien confirmée par différentes méthodes au stade L1NN (groupe antigénique 1). C'est le premier antigène L1NN caractérisé. Ce gène a été exprimé chez *E coli* et un dépôt de brevet est en cours compte tenu de son intérêt en matière de Trichinellose porcine puisque la partie C terminale est reconnue par des sérums d'animaux expérimentalement infestés.
- deux gènes codant pour des protéines fixant l'ADN (sites de fixation conserves) ont été analysés après un séquençage complet.

Un de ces gènes a été partiellement exprimé dans le periplasme de *Salmonella typhi* (plasmide pFRASEK). La localisation de la protéine synthétisée et son antigénicité sont en cours d'étude au CINVESTAV de Mexico (Contrats ECOS 1996-2000 et 2001-2005).

Deux autres gènes de moindre importance (facteur d'élongation de la traduction en particulier, AF331158 ) ont été complètement clonés et sont en cours d'analyse dans le cadre de la coopération ECOS (cf coopération internationale). De même, dans le cadre de cette même coopération un nouveau système a été mis en place pour sélectionner des antigènes spécifiques des stades précoces ; nous avons caractérisé au CINVESTAV de Mexico et dans l'UMR BIPAR (Thèse en co-tutelle de Patricia Garcia) les surnageants de muqueuse intestinale infectée par *Trichinella*. Ces surnageants sécrètent des immunoglobulines spécifiques de différentes classe/isotypes pendant 10 jours à partir de J7 et reconnaissent des fractions antigéniques spécifiques des 3 stades antigéniques définis.

- Valorisation :P19, T12, C20, C21, C22, C23, C33, C38, C43

### **III Présentation de la thématique de recherche**

Trois thèmes concernant la direction de la recherche sont décrits. Le premier présente le développement d'une nouvelle unité de recherche en parasitologie : l'unité mixte de recherche (UMR) concernant la biologie moléculaire et l'immunologie des parasites et champignons que je dirige depuis sa création. Le second s'attachera plus particulièrement au contrat européen dont j'assure la coordination et qui débutera en janvier 2002. Le dernier point traitera des relations contractualisées internationales ou nationales.

# 1 Un projet d'unité : la création de l'UMR BIPAR et son développement.

## 1.1 Origine.

La création de l'UMR BIPAR résulte d'une convergence régulière des travaux de l'unité pédagogique de parasitologie de l'ENVA (responsable J Bussieras puis R Chermette) et de l'unité parasitologie du LCRV/LERPAZ (responsable C Soulé jusqu'en 1998). Compte tenu des faibles moyens humains et financiers de l'unité Parasitologie à laquelle j'étais affecté depuis 1993, j'ai déposé un projet de contrat de recherche INSERM (CRI) en 1995. D'autres projets de recherches européens ou régionaux, avaient été tentés au cours de cette période sur la thématique *Trichinella* sans succès. La demande d'un CRI est évaluée en deux temps. À l'issue du dépôt d'un dossier scientifique concernant le projet une commission INSERM réalise un audit des équipes proposant la recherche. La conclusion principale de cette commission soulignait la nécessité de s'associer à une équipe d'immunologistes pour mener à bien le projet (annexe 04). J'ai ainsi pris contact avec D Lévy, Directeur de l'URA IPCM pour lui proposer une association dans le cadre d'un nouveau dépôt d'un CRI en 1996. L'URA IPCM était alors constituée de 3 équipes : une équipe parasitologie (*Pneumocystis carinii*), une équipe immunologie virale (FIV, BIV et BLV) et une équipe « prion anatomo-pathologie ». L'association s'est faite grâce à la participation de l'équipe de parasitologie et d'une partie de l'équipe immunologie virale. Le travail préparatoire d'un nouveau CRI fut très structurant pour rendre le projet scientifique cohérent et permettre un travail en commun des différentes équipes n'ayant jamais été fédérées auparavant pour un même objectif. Le nouveau dépôt du CRI n'a pas été retenu (thématique éloignée de l'INSERM) mais le rapprochement des équipes avait eu lieu et un travail scientifique commun (réunion scientifique hebdomadaire) pouvait se perpétuer. Le rapprochement d'équipes s'est accentué avec le recrutement d'un nouveau Maître de Conférences (MC) par l'unité pédagogique (UP) de parasitologie de l'ENVA et R Chermette alors Responsable de l'UP a proposé que le néo-recruté prenne pour thème de recherche « l'immunologie muqueuse de l'infection à *Trichinella* » afin d'établir un pont plus formel entre nos équipes et l'URA IPCM. En 1998 la DGER a lancé un programme de labellisation des unités mixtes de recherches (UMR) en remplacement des unités de recherche associées (URA). D Lévy m'ayant proposé de restructurer l'URA IPCM compte tenu du départ du responsable de l'équipe « immunologie virale ». En accord avec le personnel de cette unité et de R Chermette directeur de l'UP ENVA, j'ai proposé un projet d'UMR tripartite INRA AFSSA ENVA avec une thématique mycose, une thématique maladie vectorielle, et l'étude d'une zoonose parasitaire. La thématique maladie vectorielle dirigée par HJ Boulouis était particulièrement importante dans ce projet compte tenu de l'implication forte en immunologie locale et systémique de cette équipe sur un modèle de bactérie (*Bartonella*) transmise par les ectoparasites. L'étude des mycoses respiratoires, en dehors de son originalité de thème d'étude, devait à terme permettre le développement de modèles *ex vivo* de l'infestation des cellules hôtes ce qui n'avait pas été développé par ailleurs.

Le projet scientifique a été expertisé par le conseil scientifique de chacune des instances de tutelles y compris par un conseil d'administration de tutelle et un conseil de Direction. L'avis a toujours été favorable et a permis la création officielle de l'UMR BIPAR le 1<sup>er</sup> janvier 1999. La convention formelle de cette UMR a été signée avec un certain délai mais la date de référence demeure le 1/01/1999.

## 1.2 Le projet scientifique : Présentation du programme de recherche pour la période 1999 à 2002. Vue d'ensemble.

L' UMR BIPAR a pour objectifs l'étude des relations hôtes-pathogènes (biologie des agents, épidémiologie moléculaire, réactions immunitaires) et de leurs conséquences sur l'épidémiologie, le diagnostic et les moyens de lutte vis-à-vis des maladies parasitaires et fongiques. Un thème fédérateur a été retenu : l'étude de la Trichinellose qui a une incidence majeure dans le domaine de l'hygiène et de la sécurité des denrées d'origine animale en tant que zoonose. L'UMR poursuit les recherches déjà engagées sur deux autres sujets ayant aussi des implications en pathologie comparée : la mycose opportuniste à *Pneumocystis carinii* (recherche de la signification de la barrière d'espèce pour un agent de mycose) chez le modèle lapin, chez les primates et les infections émergentes à *Bartonella*.

Le projet de recherche fédérateur permet de **structurer** le fonctionnement de laboratoires français d'instituts différents avec d'autres laboratoires étrangers afin de rendre fonctionnel un pôle fort de recherche sur la Trichine ayant pour finalité la mise en place de nouveaux outils prophylactiques et diagnostiques chez l'homme et l'animal (espèces porcine et équine, sanglier). La stratégie appliquée vise à lutter contre cette zoonose majeure qu'est la trichinellose en assurant un diagnostic fiable ou en mettant en place une prophylaxie médicale dans les zones endémiques et à assurer une thérapeutique précoce chez l'homme infesté. Les deux autres sujets contribuent à caractériser la circulation de l'agent pathogène chez des espèces cibles, à identifier les sources d'infestation ou d'infection ainsi que les réservoirs dans l'environnement et à évaluer la diversité des espèces impliquées pour chacun des pathogènes.

La **thématique principale** des laboratoires du site permet d'identifier et de caractériser les antigènes immunodominants communs à plusieurs espèces de trichine et spécifiques des stades invasifs précoces (Adulte et L1NN) par clonage de leurs gènes et expression. Leur importance dans la réaction immunitaire de l'hôte au niveau local (muqueuse intestinale) et général sera analysée chez le porc, le rat et la souris. Leur rôle dans la physiologie du parasite (concernant la virulence) sera étudié par une cinétique et une immunolocalisation fine des cibles jointes à une transformation du parasite (étude de gène rendu silencieux chez un nématode parasite à partir des connaissances acquises chez *Coenorhabditis elegans*). La sélection d'antigènes induisant une immunité protectrice nous permettra d'élaborer un vaccin recombinant en utilisant un herpesvirus du porc (virus de la maladie d'Aujeszky) (AFSSA Ploufragan) ou des souches apathogènes de bactéries (lactobacille en particulier). L'identification de protéines immunodominantes du stade invasif est une voie privilégiée pour établir un test ELISA fiable (ne décelant pas les réactions antigéniques croisées) et sensible (introduction d'antigènes du stade adulte et L1NN pour le dépistage précoce) et d'améliorer l'efficacité du test officiel (révélation indirecte par réactif coloré, mire interne, logiciel pour une reconnaissance de forme). Enfin cette base préalable construite avec l'identification de marqueurs de virulence nous permet de développer la transgénèse de *Trichinella* ouvrant les perspectives d'étudier les relations hôtes-parasite au niveau de la cellule hôte.

Cette étude est complétée par les deux autres thèmes de recherche (*Pneumocystis carinii* (agent de mycose opportuniste) et *Bartonella* impliqués, chacun, dans un réseau international de recherche. Une méthodologie comparable à celle développée

pour l'amélioration du diagnostic de l'infestation par *Trichinella* (« nested PCR », anticorps monoclonaux) permettra de rechercher et quantifier *P. carinii* chez un animal cible: le lapin ou les primates et dans l'environnement (trouver le réservoir). Cette stratégie permet de réaliser le typage (séquençage des produits obtenus par PCR) des souches décelées et d'identifier des marqueurs de souche ou génotype. En tant qu'infection émergente, la physiopathologie des *Bartonella* sera caractérisée et des méthodes de diagnostic seront proposées (sérologique: ELISA, PCR). Ces dernières résulteront de l'expérience acquise dans les deux autres thèmes de recherche.

- Contexte et enjeux économiques

Alors que de nombreuses affections virales ou bactériennes ont été maîtrisées en médecine vétérinaire, les maladies parasitaires et fongiques demeurent à l'heure actuelle d'importance majeure, sont même en augmentation pour certaines d'entre elles, justifiant que l'on y consacre des efforts importants. *Trichinella* a un impact majeur en santé publique dans de nombreux pays (§2.1). De même *Bartonella* et *P. carinii* causent des infections graves chez l'homme dans un contexte épidémiologique donné et il importe de connaître le cycle de ces agents pathogènes afin de mettre en place des outils pour la prophylaxie et la détection.

### **1.2.1 Projet fédérateur de Recherche de l'Equipe : L'infestation précoce de la Trichine: immunité intestinale protectrice, déterminisme de la virulence et amélioration du diagnostic.**

Ce projet de recherche est développé dans l'équipe *Trichinella* que je dirige. Le thème de recherche correspond pour une partie à la continuité de ce qui a été développé précédemment dans les paragraphes 2.2 à 2.5. Il inclut en plus la thématique immunité muqueuse et l'étude des adjuvants dans l'immunité locale que nous décrivons dans cette partie.

Ce projet de recherche est soutenu par un contrat européen TRICHIPORSE (2001-2004) que nous présenterons ultérieurement, deux contrats aliment-qualité sécurité (AQS) et un contrat ECOS que je coordonne. D'autres contrats de moindre importance apportent des bourses de thèse ou des financements ponctuels pour des enquêtes épidémiologiques (Annexe 3).

#### **1.2.1.1 Objectifs:**

Ils tendent à mettre en place des méthodes prophylactiques et diagnostiques de la trichinellose chez l'animal et l'homme. L'amélioration du dépistage sérologique et de la méthode de détection officielle (test direct) sont nécessaires pour pouvoir déclarer des zones (élevages dans un premier temps) officiellement indemnes et obtenir une identification plus sûre des porteurs. Un second axe stratégique vise à décrire les mécanismes et les effecteurs de la réponse immune protectrice au niveau de la muqueuse intestinale de l'hôte.

Cet axe est en cours de développement actuellement sous la responsabilité d'I Vallée, CR2, qui est affectée dans l'équipe *Trichinella*. Le développement de l'immunité anti-trichine n'a pu être réalisé que dans le cadre de l'association des équipes INRA, AFSSA et ENVA : c'est une des potentialisations majeures de l'UMR.

Le projet de recherche vise à acquérir des connaissances fondamentales sur les relations étroites entre *Trichinella* (nématode parasite des mammifères), la cellule épithéliale intestinale hôte et les cellules de l'immunité locale (essentiellement mastocytes) qui conduisent à l'élaboration d'une réponse immunitaire protectrice. A

ce jour, le niveau de connaissance dans ce domaine est relativement limité (Bell, 1998) et s'explique par l'absence de modèles cellulaires permettant de disséquer *in vitro* les mécanismes impliqués dans les interactions *Trichinella* / Hôte. Les modèles *in vitro* ciblés sur les cellules mastocytaires (modèle rat et modèle porc) seront donc un atout majeur pour appréhender l'étude de ces interactions et permettront notamment de tester ultérieurement des antigènes recombinants spécifiques des stades intestinaux de *Trichinella*.

#### 1.2.1.2 L'immunité muqueuse anti-*Trichinella*

D'abord descriptive (on s'attachera à identifier les cellules impliquées dans la réponse muqueuse à l'infection par *Trichinella*), la recherche s'appliquera à développer un modèle *ex vivo* de la réaction immunitaire complexe anti-*Trichinella* avec l'isolement et la purification des effecteurs. Le but final est bien de pouvoir reproduire la présentation d'épitope critique au niveau mucosal afin de mimer la réponse protectrice obtenue après une primo infestation massive.

##### a Effecteurs de l'immunité protectrice à une infestation par *Trichinella*:

La réponse immunitaire protectrice vis-à-vis de *Trichinella* consiste à bloquer le passage dans le flux sanguin des larves L1NN. Différents mécanismes peuvent être impliqués comme l'expulsion précoce des adultes, la neutralisation des L1NN, le blocage de la pénétration des L1 infestantes. Nous envisageons de caractériser et de quantifier les effecteurs de cette réponse afin d'évaluer à terme les cibles antigéniques caractérisées. Par ailleurs cette expérimentation vise à compléter ce qui est réalisé dans le CINVESTAV de Mexico (contrat ECOS 2001-2005) avec le modèle porc. Seront donc recherchés au niveau de l'épithélium intestinal dans le modèle souris:

- par immuno-histochimie, l'induction d'une production d'IgA sécrétoire, et l'activation de lymphocytes intra-épithéliaux après une primo-infestation par *T spiralis* ou *T britovi*.
- puis, l'isolement de lymphocytes intra-épithéliaux en vue de la caractérisation de leur spécificité immune par immuno-histochimie et test ELISPOT sera effectué. Notamment seront étudiés le type de cytokines synthétisées (réponse Th2) et leur cinétique lors d'une réinfestation avec *T spiralis* ou *T britovi*. L'influence d'infestations par d'autres parasites sera également analysée.
- fera suite à cette caractérisation une immortalisation des lymphocytes B et T provenant de la muqueuse intestinale infestée.

Dans un premier temps, la réponse immune locale vis-à-vis des infestations et réinfestations par deux espèces de trichine (*T.spiralis* et *T.britovi*) sera étudiée. Les populations lymphocytaires intra-muqueuses et les cytokines sécrétées seront étudiées de façon cinétique au cours des infestations. Le caractère protecteur des primo-infestations sera abordé.

Puis, les interactions entre l'infestation par *Trichinella* et les infestations/infections par d'autres agents pathogènes à localisation intestinale seront étudiées. Ces interactions correspondent à ce qui est naturellement observé dans les hôtes naturels de *Trichinella*, d'où le passage du modèle souris aux modèles rats et porcs. Les épitopes reconnus par les populations lymphocytaires immortalisées seront analysés et comparés aux autres épitopes décrits dans le genre *Trichinella*.

Dans le contexte d'un écosystème digestif SPF ou comprenant divers parasites, des antigènes de *Trichinella* recombinants induisant une immunité protectrice locale

seront testés selon diverses stratégies de présentation notamment en utilisant des adjuvants (contrat de recherche et développement avec la SEPPIC (1999-2002 renouvelable).

*b Cytotoxicité directe ou médiée par des Anticorps monoclonaux spécifiques des stades L1NN, adulte ou L1M.*

Le transfert passif d'anticorps monoclonaux de classe IgG1 et IgG2 induit une réponse protectrice de type « expulsion rapide » laissant suspecter qu'il existe des mécanismes de l'immunité locale distincts de ceux médiés par les IgE. Une étude de la protection *in vivo* des souris vis-à-vis des *Trichinella* sera opérée à l'aide d'AcM sélectionnés (décrits précédemment au paragraphe II2.4) transférés passivement. La cytotoxicité des lymphocytes périphériques ou locaux sur L1NN sera étudiée *in vitro* par un test d'inactivation des L1NN (en utilisant soit des lymphocytes immuns soit des AcM (réduction de la mobilité), soit l'association de ces deux effecteurs).

Il sera ainsi possible de caractériser le rôle biologique des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de différents stades chez la souris et d'identifier les antigènes impliqués dans l'induction d'une protection humorale locale et générale.

Le rôle biologique de chaque anticorps monoclonal sera exploré *in vivo* par transfert passif chez des souris non infestées ou primo-infestées. Les effets biologiques de ce transfert seront recherchés, lors de l'infestation ou de la réinfestation, sur les différents stades reconnus par l'anticorps transféré.

Le rôle des antigènes reconnus par les anticorps ayant une activité biologique sera vérifié *in vivo* (immunisation et épreuve) et *in vivo-vitro* (nature de la réponse induite).

*c Analyse de la réponse mastocytaire : Projet de recherche faisant l'objet d'un contrat ECOS 2001-2005*

Les mastocytes interagissent au niveau de différents effecteurs de la réponse muqueuse et peuvent être directement stimulées par des antigènes bactériens (Abraham et Malaviya, 1997). Les rats infestés par *Trichinella* présentent une forte mastocytose (Arizmendi-Puga, 1996). avec un rejet précoce des adultes (10 jours). Les porcs infestés n'ont pas cette mastocytose et la survie des adultes dans le tube digestif dépasse les 3 semaines. Le porc est le véhicule principal de l'infestation à *Trichinella* chez l'homme dans le monde. Nous avons émis l'hypothèse que les mastocytes sont à la base de cette différence de réaction de l'hôte vis-à-vis du parasite d'où le développement particulier de ce thème.

1/ Etat actuel du sujet

Les travaux réalisés au CINVESTAV de Mexico montrent qu'une suspension d'antigènes totaux de *Trichinella* induit une activation directe des mastocytes indépendamment des IgE (Arizmendi-Puga, 1996). Les mastocytes intra-péritonéaux de rats incubés *in vitro* avec des antigènes totaux de *T. spiralis* (stade L1 Musculaire, L1M) et en absence d'IgE libèrent dans le surnageant de culture de l'histamine et du TNF-alpha (Arizmendi-Puga, 1996).

Le travail en cours consiste à caractériser les mécanismes impliqués dans l'activation directe des mastocytes et plus particulièrement à identifier le récepteur membranaire impliqué dans cette activation. Dans la mesure où la production de TNF-alpha et d'histamine est observée en absence d'IgE, nous pensons que le récepteur aux IgE (FcεR) n'est pas impliqué dans cette activation mastocytaire. Le récepteur impliqué serait spécifique d'un type d'antigène exprimé par *Trichinella*. La caractérisation de ce récepteur repose notamment sur la technique d'immunofluorescence en

microscopie confocale permettant de révéler ou non une co-localisation des antigènes de *Trichinella* sur la membrane cytoplasmique mastocytaire avec différents récepteurs tels que FcεR ou CD48 (Shin et al, 1999). Parallèlement, les antigènes de *Trichinella* impliqués dans la dégranulation mastocytaire ont été caractérisés. L'anticorps monoclonal B6B6 dirigé contre les antigènes de surface de *T. spiralis* (stade L1M et Ad) permet de purifier par chromatographie d'affinité ces antigènes et de les tester *in vitro* pour leur capacité à induire une activation mastocytaire. La fraction antigénique TSL-1 présente une co-localisation avec le CD48 (ligand de CD2) à la surface membranaire des mastocytes (Travail en cours de thèse de V Niborski en co-direction avec I Vallée).

Récemment des mastocytes porcins ont été isolés à partir de moelle osseuse fœtale au laboratoire. Des cultures primaires de mastocytes à long terme (plus de 450 jours) ont été obtenues en présence de cytokines porcines (SCF (*stem cell growth factor*), et d'interleukine 3)(dépôt de brevet en cours concernant la mise en culture de ces cellules et leur caractérisation). Ces cellules sont caractérisées. Elles produisent de l'héparine et expriment la protéine membranaire c-kit (ligand du SCF).

Par ailleurs, nous étudions la réponse immunitaire locale intestinale en réponse à l'infection par *Trichinella* dans le modèle murin (Balb/c). Des techniques d'isolement des populations lymphocytaires des différents compartiments de la muqueuse intestinale ont été mises au point (travail réalisé par I Vallée et L Sofronic post doctorante au laboratoire). Ainsi, les lymphocytes intra-épithéliaux (LIEs)(majoritairement CD8+), les lymphocytes de la lamina propria (LLPs)(majoritairement CD4+) ou des plaques de Peyer (LPPs)(riches en CD19+) sont obtenus en routine. L'évolution des différentes populations lymphocytaires (CD4+, CD8+, CD19+) de ces compartiments muqueux est analysée en cytométrie en flux et en immunohistochimie au cours de cinétiques d'infestation de souris Balb/c par *T. spiralis*. Nous analysons également l'expression membranaire des marqueurs d'activation (CD71, MHC classe II...) sur ces lymphocytes isolés au cours de l'infestation. Enfin, la capacité des lymphocytes T (d'animaux infestés ou naïfs) à proliférer vis-à-vis des antigènes de *Trichinella* purifiés soit à partir des stades Adultes/L1Nouveau-Nées, soit du stade L1M est évaluée par le test d'incorporation de thymidine tritiée.

- Valorisation : C46, C49, C51,C52, C53

## 2/: Projet de recherche

### **a Caractérisation de l'activation mastocytaire de rat par les antigènes de *Trichinella***

- Puisque la fraction antigénique TSL-1 co-localise avec le récepteur CD48, nous déterminerons si les antigènes lient le CD48. Pour cela nous utiliserons des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le CD48 afin de bloquer la fixation des antigènes sur le CD48. Nous analyserons alors la fixation des antigènes par immunofluorescence. La transfection de cellules cos par le cDNA de CD48 pourra également être effectuée afin de tester la liaison des antigènes de manière plus spécifique sur le CD48 de rat.
- Nous analyserons le profil des médiateurs pro-inflammatoires, cytokines et chimiokines synthétisés par les mastocytes activés avec les antigènes de *Trichinella*. Pour le dosage du TNF-alpha et de l'histamine relargués dans le surnageant de culture nous utiliserons respectivement un kit (Endogene) et le test de dosage biochimique mis au point au laboratoire du Dr A. Enciso (Centro Medico, Mexico-City, Mexique). Quant au dosage des différentes cytokines (IL4,

IL5, IL6, IL10, IL12, IL13) et chimiokines (MCP-1, IL8, RANTES), il sera réalisé par ELISA ou RT-PCR.

- Afin de déterminer si la stimulation *via* les antigènes de *Trichinella* reproduit un signal comparable à celui obtenu par la voie « classique » d'activation mastocytaire dépendante des IgE, nous comparerons les profils cytokiniques obtenus avec les deux types de stimulation mastocytaire.
- Le signal secondaire déclenché par la fixation au récepteur membranaire sera analysé. L'implication des protéines G, de kinase... dans la transmission du signal sera montrée.

### **b Caractérisation de l'activation mastocytaire de porc par les antigènes de *Trichinella***

Les analyses effectuées sur lignées mastocytaires de rats seront réalisées sur les mastocytes de porc obtenus au laboratoire afin d'évaluer le degré de fixation et de caractériser le récepteur selon les mêmes procédés que précédemment décrits. L'identification du CD48 porcine sera nécessaire si une fixation positive de l'antigène TSL1 de *Trichinella* est obtenue.

### **c Etude des interactions entre les mastocytes activés et les lymphocytes T muqueux**

La co-culture de mastocytes activés (ou de leur surnageant de culture) par les antigènes de *Trichinella* avec les différentes sous-populations lymphocytaires de la muqueuse intestinale (LIEs, LLPs, LPPs) permettra de comprendre le rôle joué par les mastocytes dans l'activation lymphocytaire. Les mastocytes activés (ou leur surnageant de culture) seront analysés pour leur capacité à induire l'expression de marqueurs d'activation lymphocytaire. Ce travail sera effectué d'une part en cytométrie de flux par l'analyse des différents marqueurs d'activation membranaires (CD69, CD71, CMH de classe II) ou intra-cellulaires (IL2, ki-67). D'autre part, l'induction d'une réponse proliférative lymphocytaire vis-à-vis des mastocytes activés (ou de leur surnageant de culture) sera évaluée par incorporation de thymidine tritiée.

Le modèle de co-culture de mastocytes et de lymphocytes muqueux (LIEs, LLPs ou LPPs) permettra d'évaluer la capacité des mastocytes activés à induire une différenciation lymphocytaire soit vers la voie Th1 soit vers la voie Th2. Ce travail s'effectuera en RT-PCR par l'analyse de l'expression des interleukines IL12, IL18 et IFN-gamma pour le profil Th1, ou IL4, IL5, IL6, IL10 et IL13 pour le profil Th2.

### **Etude des interactions entre les mastocytes activés et les entérocytes**

La mise au point du modèle de pénétration/développement de *Trichinella* dans les entérocytes en culture permettra de répondre aux questions suivantes :

1/ les cellules épithéliales parasitées par *Trichinella* expriment-elles un phénotype pro-inflammatoire?

2/ les cellules épithéliales parasitées participent-elles à l'initiation de la réponse immunitaire locale?

### **Peut-on mimer la réponse immunitaire locale avec des antigènes purifiés des stades invasifs de *Trichinella* ou exprimés par la cellule épithéliale ?**

Le dernier point du contrat de recherche ECOS obtenu sera de reproduire avec des antigènes recombinants décrits dans la section II 2.5.3/4, la réponse immunitaire locale induite par l'invasion de *Trichinella*.

Nous avons déjà cité différents antigènes recombinants spécifiques des différents stades parasites qui seront utilisés dans le modèle de co-culture sous forme pure ou en présence d'adjuvants. L'expression transitoire des gènes codant pour ces antigènes dans les entérocytes sera une autre voie d'étude de l'activation lymphocytaire et mastocytaire. Nous pourrons alors analyser l'activation des différents acteurs de la réponse immunitaire locale en réponse à ces antigènes.

### **1.2.2) *Pneumocystis carinii* chez le lapin et les primates. Modèle pour la pneumocystose humaine**

Ce sujet est développé par R Chermette, B Pollack et J Guillot dans l'UMR BIPAR.

- Mots-clés : maladies émergentes, affections opportunistes, franchissement de la barrière d'espèces, modèles animaux, santé publique vétérinaire
- Situation du sujet

*Pneumocystis carinii*, est un champignon atypique qui provoque chez l'homme une maladie opportuniste grave, la pneumocystose. La pneumocystose est également décrite chez l'animal mais ne représente pas actuellement un réel problème économique ; l'infection a été rapportée principalement chez des sujets immunodéficients : rat nude, souris SCID, lapin au sevrage, poulain, porcelet, chien, chat, furet.

La dénomination *P. carinii* masque en réalité un ensemble de microorganismes génétiquement distincts (Wakefield *et al.* 1998). Chacun de ces microorganismes, que certains n'hésitent pas à élever au rang d'espèce, semble inféodé à une espèce de mammifère particulière. En raison de cette forte spécificité d'hôte, la pneumocystose ne doit pas être considérée comme une zoonose. L'homme possède donc "son propre" *P. carinii* mais nous ne connaissons pas à l'heure actuelle la (ou les) source(s) d'infection, la forme infectante, les mécanismes de transmission ni même le cycle évolutif complet de *P. carinii*...En fait, il n'existe aucun système de culture continue de *P. carinii*. Seule une multiplication limitée du nombre de parasites peut être obtenue après inoculation sur culture cellulaire d'une suspension parasitaire fraîchement extraite d'un poumon (Dei-Cas *et al.* 1996). L'absence de culture *in vitro* en continu rend difficile l'étude de *P. carinii* et le recours à un modèle animal apparaît indispensable pour répondre au défi épidémiologique posé par la pneumocystose.

- Objectif général

Il vise à comprendre la circulation de *P. carinii* dans différents écosystèmes (lapin et primates) en réalisant:

- La caractérisation de l'infection,
- La recherche des sources et des réservoirs de *P. carinii* dans l'environnement,
- La caractérisation des souches de *P. carinii*.

Les résultats obtenus devraient être utiles pour appréhender les différents aspects de l'épidémiologie de la pneumocystose humaine.

- Objectifs spécifiques - Méthodologie

La recherche des sources et des réservoirs de *P. carinii* du lapin et des primates dans l'environnement nécessite la maîtrise de méthodes d'isolement du champignon. Deux approches sont envisagées :

la mise en évidence de l'ADN du parasite par amplification génique (PCR) sur des prélèvements d'air. Cette technique a permis de mettre en évidence de l'ADN de *P. carinii* de l'homme à proximité de patients atteints de pneumocystose (Bartlett et al. 1994) et de l'ADN de souches du rat ou du lapin à côté d'animaux infectés appartenant à l'espèce correspondante (Olsson et al. 1996, Latouche et al. 1997). Il a également été possible de mettre en évidence de l'ADN de souches humaines et du rat dans l'atmosphère en milieu rural (Wakefield 1996). La présence de souches de *P. carinii* de l'homme, dans des zones où la densité de population humaine est faible, suggère l'existence de sources ou de réservoirs dans l'environnement. Cependant, le principal inconvénient de la technique d'amplification génique sur prélèvement d'air est l'impossibilité de déterminer si les formes fongiques détectées sont viables et infectantes.

Le typage est nécessaire pour vérifier l'identité des souches de *P. carinii* mises en évidence par aspiration de l'air avec celles retrouvées chez les animaux sentinelles. Le séquençage de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique mitochondrial (mt LSU) a déjà été mis à profit pour la caractérisation de *P. carinii* chez l'homme (Lee et al. 1993, Latouche et al. 1997) ; quatre types séquentiels ont été définis. Le séquençage d'autres gènes, en particulier des ITS (Internal Transcribed Spacers), présents dans l'ADN nucléaire, est envisagé. A ce jour, plus de 60 types séquentiels ont pu être définis pour les souches humaines (Lee et al. 1997). L'amplification génique est obtenue en deux étapes ("nested PCR"). Un premier couple d'amorces (spécifiques de *P. carinii*) permet l'amplification d'une zone étendue sur laquelle s'effectue une seconde amplification (Lu et al. 1994). Les produits PCR, une fois purifiés, sont directement séquencés sans clonage préalable avec un séquenceur automatique. Dans l'hypothèse d'une variabilité suffisamment importante et lorsque un grand nombre de souches auront été caractérisées, l'étape du séquençage pourra être remplacée par le recours à des techniques d'électrophorèse très sensibles comme la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Hauser et al. 1997).

La recherche de marqueur microsatellite sera initiée afin de typer plus précisément les souches et suivre leur évolution dans l'environnement. La difficulté principale actuelle réside dans l'impossibilité de réaliser une purification complète de *Pneumocystis* à partir des organes infestés et l'absence de propagation dans un modèle *ex vivo*.

### **1.2.3) Infections à Bartonella: caractérisation du réservoir animal, détection, transmission, modèles animaux expérimentaux.**

Ce sujet de recherche est sous la responsabilité de HJ Boulouis. Il a été mis en œuvre par F Barrat pendant plusieurs années. L'équipe a été renforcée récemment par le recrutement de M Vayssier Taussat CR1 INRA.

- Mots-clés : maladies émergentes, franchissement de la barrière d'espèces, modèles animaux, santé publique vétérinaire.

#### Contexte scientifique

Les *Bartonella* sont des bactéries hémotrophes responsables d'infections émergentes pour l'homme et l'animal. Treize espèces au moins sont actuellement décrites parmi lesquelles six sont pathogènes pour l'homme : *B. bacilliformis* : maladie de Carrion ; *B. quintana* : endocardites,... ; *B. henselae* et *B. clarridgeiae* : maladie des griffes du chat ; *B. elizabethae* ; *B. vinsonii*. La transmission par des

arthropodes est démontrée pour certaines espèces ou suspectée. Les autres espèces sont isolées du sang de nombreux animaux domestiques ou sauvages. Certains de ces animaux sont des réservoirs identifiés de *Bartonella* pathogène pour l'homme (Chat pour *B. henselae* et *B. clarridgeiae*, rat pour *B. elizabethae*). Jusqu'à ce jour, le pouvoir pathogène de *Bartonella* pour les animaux est inconnu.

La physio-pathologie de ces infections est encore méconnue. Les *Bartonella* sont capables de pénétrer *in vitro* non seulement les érythrocytes, mais aussi les cellules endothéliales et épithéliales en culture. Une autre particularité commune à certaines espèces (*B. bacilliformis*, *B. henselae* et *B. quintana*) est leur aptitude à provoquer une prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et d'induire *in vivo* une angiogénèse lors de la colonisation des tissus vasculaires ce qui n'est pas sans rappeler la néo vascularisation générée autour de la cellule nourricière de *Trichinella*. Enfin, chez certains hôtes la bactériémie s'accompagne d'une séronégativité (Cervidés, micromammifères,...), alors que chez d'autres (Chat) la bactériémie est concomitante d'une séropositivité.

Le nombre des espèces de *Bartonella* décrites s'est considérablement accru ainsi que, parallèlement, le nombre de pathologie humaines, souvent graves, qui leur sont attribuées. La découverte croissante de nouvelles espèces chez les animaux, le fait qu'elles puissent être transmises à l'homme ou aux animaux par des arthropodes font penser que d'autres espèces de *Bartonella* pour lesquelles il n'existe pas encore d'outils diagnostiques pourraient être responsables de manifestations pathologiques humaines ou animales encore méconnues.

#### □ Objectifs spécifiques - Méthodologie

Ils visent à identifier des nouveaux réservoirs de *Bartonella*. Pour cela des récoltes et mise en culture (gélose au sang de lapin sous 5% de CO<sub>2</sub>) de prélèvements sanguins effectués chez les espèces les plus susceptibles de contaminer l'homme, en particulier les animaux de rente (bovins, ovins, caprins,...), de compagnie (chien, chat, cheval,...) et de zoo seront effectuées. Plusieurs représentants de chacune des espèces seront testés. Les souches isolées, identifiées par biologie moléculaire (Séquençage ARN16S et citrate synthase), seront utilisées pour l'élaboration de nouveaux outils diagnostiques de ces infections et pour suivre la présence de *Bartonella* d'une espèce donnée dans différents ectoparasites. La méthodologie est proche de celle mise en œuvre pour *P. carinii* et permet des mises en commun de moyens.

Pour les espèces trouvées porteuses de *Bartonella*, une enquête épidémiologique sur la prévalence de l'infection permettant d'évaluer le risque de contamination humaine et de dépister un lien éventuel entre infection et pathologie chez l'animal (et chez l'homme) sera mise en œuvre. Deux méthodes sont employées : la mise en culture et la sérologie par Immunofluorescence indirecte (antigène : cellules Vero infectées) ou ELISA (antigène : Outer Membrane Protein). L'existence d'animaux bactériémiques et séronégatifs (cervidés et micromammifères) impose dans un premier temps ces deux méthodes. A terme le développement d'anticorps monoclonaux permettra une recherche de bactériémie par ELISA capture comme cela est envisagé pour le diagnostic précoce des Trichinelloses animales.

Le développement de modèles animaux expérimentaux sera rendu possible par l'isolement de différentes souches de *Bartonella* de micromammifères sauvages. La modélisation de l'infection bartonellique est en cours de développement avec un modèle souris. L'interaction entre l'infection bartonellique et le système immunitaire

sera étudiée chez cette espèce, pour laquelle les outils en immunologie sont les plus accessibles et les plus nombreux : réponses immunitaires spécifiques humorales (taux des différentes classes et sous classes d'anticorps circulants) et cellulaires (prolifération, étude des populations fonctionnelles Th1 et Th2, étude des marqueurs d'activation des lymphocytes, dosage de cytokines). L'utilisation de souris knock out ou immunodéprimées permettra de préciser le rôle du système immunitaire au cours de l'infection naturelle à *Bartonella*. L'extrapolation des résultats à d'autres espèces (chat) sera envisagée. Enfin, le modèle murin sera utilisé pour statuer sur la possible induction d'une tolérance par passage transplacentaire et d'une éventuelle incidence de l'infection sur les performances de reproduction.

## **1.2 La mise en œuvre du projet de l'UMR BIPAR**

De façon connexe au développement de la recherche et des différentes équipes constituant l'UMR BIPAR, une implication dans un cursus de 3<sup>ème</sup> cycle a été réalisée et s'est intensifiée année après année (appartenance à différentes écoles doctorales, participation à divers enseignements en incluant les certificats de maîtrise....). L'UMR BIPAR est maintenant prête à former les étudiants à la recherche par sa structure et les moyens disponibles (accroissement du budget de fonctionnement de 100% en 3 ans) (Figure 06).

### ***Etape de stabilisation 1998-1999***

La structuration scientifique de l'UMR s'est accompagnée de l'extinction de toute la thématique « immunité virale » au profit du développement de « l'immunité muqueuse anti parasitaire » avec à terme l'émergence d'une nouvelle équipe plus transversale au sein de l'UMR (immunité muqueuse). La thématique « prion » a rejoint une autre équipe de virologie sur le site compte tenu de l'éloignement des modèles utilisés.

L' UMR a été structurée en 3 équipes selon les trois thèmes de recherche présentés.

### ***Etape de développement 1999-2000***

Une phase de recrutement et d'agrégation de personnel a permis de stabiliser l'effectif de l'unité puis de le faire croître en passant de 25 à 32 sur une période de 1 an et demi avec le recrutement d'un CR2 (I Vallée), l'obtention de deux bourses post doctorants INRA, l'affectation d'un TSV (T Roman), de deux AGT (INRA) et l'arrivée de ML Labbat (DR1) sur la thématique *Trichinella*.

Au niveau scientifique cette période est caractérisée essentiellement par la co-organisation avec J Dupouy Camet du congrès international sur la Trichinellose (Annexe 02). Des résultats de recherches marquants ont été obtenus pour la thématique *Pneumocystis* avec la démonstration de la co évolution *Pneumocystis carinii*/ primates. En parallèle l'équipe *Bartonella* achevait de mettre en place un modèle originale avec *Bartonella birtlesii* infectant la souris.

### ***Etape d'extension et production 2000-2001***

#### **Thème1 *Trichinella***

- 1. Axe prophylaxie sanitaire de l'infection à Trichinella : dépistage du parasite dans les viandes et mise sur le marché d'une viande indemne de Trichinella.***

Plusieurs projets de recherches permettent de répondre aux deux questions suivantes :

- Comment réaliser un diagnostic précoce indirect chez le porc pour la mise en place d'un suivi systématique des élevages à risque ?
- Comment automatiser le diagnostic direct de la trichinellose équine?

Un projet AQS 2001-2003 a été accepté pour assurer le développement d'un ELISA précoce chez le porc. Un projet européen a été classé puis accepté pour répondre à ces deux questions. Deux contrats ONC :DGAL (2000-2001 et 2000-2003) permettent d'effectuer une enquête épidémiologique chez le sanglier et de valider le fluide musculaire comme prélèvement alternatif. Enfin une nouvelle action ECOS de 4 ans a été acceptée et a pour sujet l'activation mastocytaire par des antigènes de *Trichinella*.

## *2. Axe prophylaxie médicale de l'infection à Trichinella : Immunité locale protectrice induite par un nématode parasite.*

- 2.1 Le nouveau projet AFSSA déposé par I Vallée « Etude des interactions entre *Trichinella*, les entérocytes et le système immunitaire local intestinal : développement d'un modèle in vitro » (PR-2001/SA16) a été accepté (budget sur la dotation propre de l'UMR).
- 2.2 Des lignées mastocytaires de porc ont été caractérisées et leur production est maintenant bien maîtrisée même si elles dépendent toujours de facteurs trophiques porcins.
  - Différents adjuvants ont été évalués en utilisant l'antigène soluble de *Trichinella*. Les nanoparticules s'avèrent particulièrement intéressantes et leur innocuité est excellente (activité contractualisée avec la SEPPIC).

**Figure 06 : Implication de l'UMR BIPAR dans l'enseignement de 3<sup>ème</sup> cycle**

L'UMR BIPAR est labellisée dans 3 écoles doctorales.

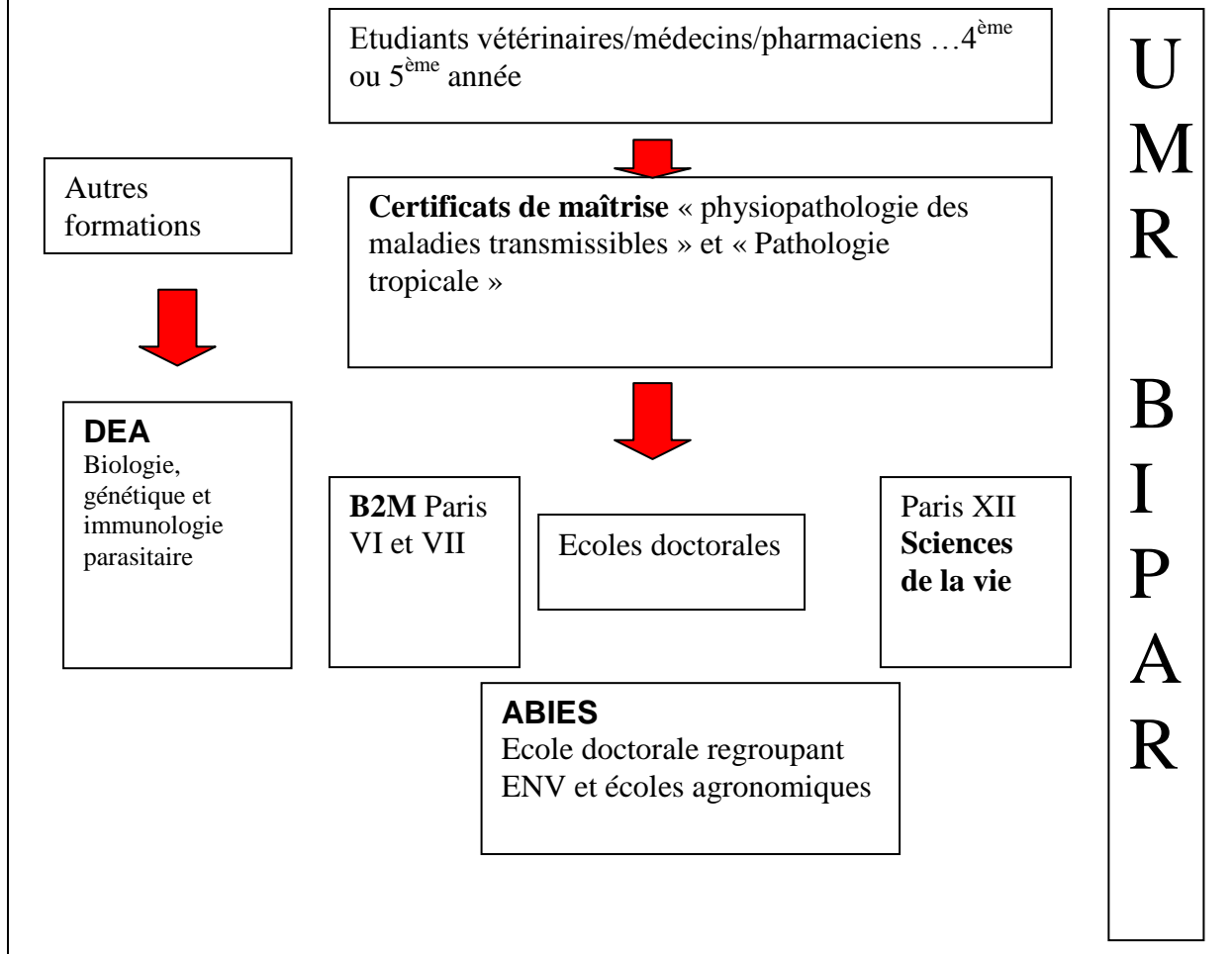
Equipe *Bartonella* Ecologie Epidémiologie (HJ Boulouis) : Ecole doctorale ABIES

Equipe *Pneumocystis Carinii* (R Chermette) : Ecole doctorale Paris XII Sciences de la vie

Equipe *Trichinella et immunité mucosale* (P Boireau) Ecole doctorale B2M, Paris VI et Paris VII.

Les équipes sont impliquées dans le DEA «Biologie, Génétique et immunologie des infections parasitaires ».

L'UMR BIPAR est également impliquée dans les certificats de maîtrise "physiopathologie des maladies transmissibles" et «Pathologie tropicale » assurant ainsi aux étudiants de l'ENVA la possibilité de réaliser un cursus doctoral complet en Parasitologie et Mycologie.



## **Thème 2 : Maladies transmises par les tiques**

### *1. Axe : zoonose, Bartonella maladie émergente transmise par les tiques*

#### Etude de l'infection par *Bartonella* des bovins.

L'isolement de *Bartonella* chez les bovins a permis de caractériser dans un premier temps deux types RFLP de souches relativement proches. Le premier type a fait l'objet d'une description complète. La sérologie par Immunofluorescence et par ELISA montre une disparition des anticorps IgG chez les animaux âgés et une faible corrélation entre la séropositivité et la bactériémie. Par ailleurs l'étude de l'apparition de la bactériémie en fonction de la saison de prélèvement semble indiquer que la primo-infection a lieu en été et à l'automne. Ce fait relativise le rôle des tiques comme vecteurs de cette bactérie au profit d'un ou plusieurs autres arthropodes hématophages.

## **Thème 3 : mycologie**

La mise en place d'un nouveau sujet sur les aspergilloses aviaires (mycoses respiratoires) dans le cadre des maladies émergentes d'intérêt vétérinaire et médical s'intègre dans le cas de l'extension de l'UMR BIPAR à une quatrième tutelle : l'université Paris Val de Marne (UPVM).

### *1. Axe "Circulation de *Pneumocystis carinii* dans les écosystèmes."*

La caractérisation moléculaire des souches de *P. carinii* provenant de singes a permis de confirmer la stricte spécificité d'hôte du champignon. Par ailleurs, la phylogénie des parasites est très semblable à celle de leurs hôtes ce qui est en faveur d'un processus de co-évolution. Le travail de DEA est poursuivi par une thèse d'Université (Paris XII) avec un financement de l'Ecole Doctorale (bourse de thèse pour C Demanche). Le thème de recherche est soutenu par le réseau national "*Pneumocystis*" (Programme MENRT). Un contrat européen est en cours de préparation.

### *2. Axe "Aspergilloses" Nouveau thème de l'unité*

Les aspergilloses des oiseaux sont des affections fréquentes qui sont responsables de pertes économiques importantes en élevage. Depuis octobre 2000, une enquête épidémiologique est conduite dans un élevage de dindes dans le Loiret. Une étudiante actuellement en stage de DEA (Biologie, Génétique et Immunologie des infections parasitaires, Paris VI 2000-2001) se rend chaque semaine dans l'élevage pour réaliser des prélèvements mycologiques dans l'environnement (analyse de l'air, de la nourriture et de la litière) ainsi que sur quelques animaux (prélèvements trachéaux). Les oiseaux morts sont systématiquement autopsiés. Ce travail permet d'isoler un grand nombre de souches d'*Aspergillus fumigatus*. Les souches de l'environnement ainsi que celles mises en évidence dans l'appareil respiratoire des oiseaux sont comparées par l'analyse du polymorphisme des microsatellites (en collaboration avec S Bretagne du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII). L'équipe s'est intégrée à une action transversale retenue par la DG de l'INRA. A ce titre *Aspergillus fumigatus* a été un nouvel axe de recherche pour l'équipe. L'étude du typage moléculaire d'espèces aviaires et la corrélation entre certains phénotypes et pathotypes ont été montrés. Une association avec l'équipe de parasitologie de Paris XII porte sur la thématique *Aspergillus fumigatus*. Le projet d'association a été soumis aux différents CS des tutelles qui ont donné un avis favorable pour l'extension.

## 2 Le contrat européen TRICHIPORSE 2002-2004

### 2.1 Les objectifs généraux:

L'objectif ultime est de mettre sur le marché européen de la viande indemne de parasite. Le projet suit l'une des recommandations du groupe de travail européen sur *Trichinella* (DGXXIV, mission 2000): "There is a strong need for improvement of diagnostic methods in terms of sensitivity, specificity, survey diagnosis, automation of direct methods and proper validation of such tests".

Les objectifs spécifiques sont: (Figure 07)

1) Mise en place d'un test standardisé chez le porc: après avoir sélectionné un ou plusieurs isolats de référence, des épitopes immunodominants des stades invasifs seront sélectionnés. Pour cela différents gènes spécifiques des stades précoces seront caractérisés et exprimés dans divers systèmes. Des épitopes B seront délimités. (Figure 08)

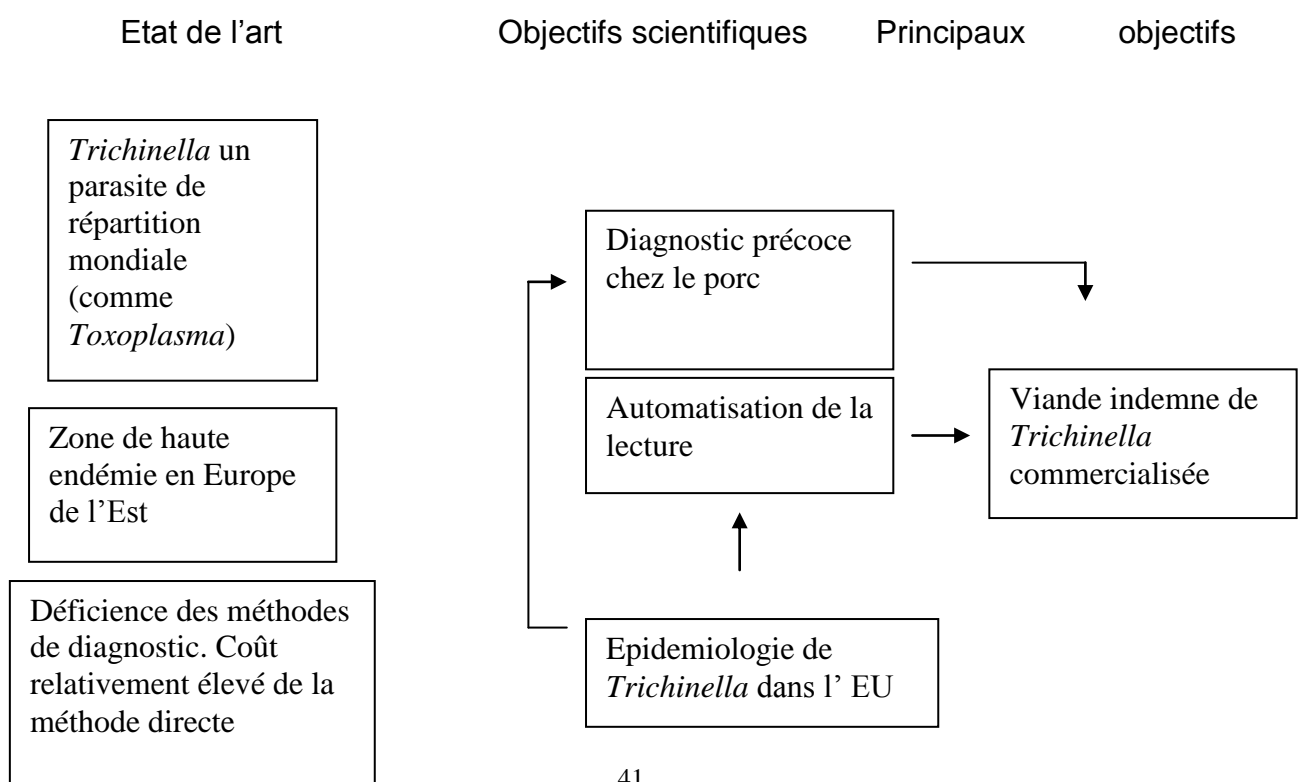
Le fluide musculaire sera utilisé comme une méthode alternative d'échantillonnage. La trichinellose est un modèle idéal pour valider ce type de prélèvement.

2) Lecture automatisée avec un système de reconnaissance de forme doté d'un système expert d'enrichissement automatique de "formes". Ce logiciel pourra être couplé à un système de digestion automatisé. (Figure 08)

Les sites d'élection du cheval expérimentalement infecté seront déterminés pour plusieurs espèces de trichine infestantes.

3) Une enquête épidémiologique en Europe (particulièrement dans des pays d'Europe de l'Est) sera menée chez le cheval, le porc et la faune sauvage.

**Figure 07:** Objectifs pour prévenir la Trichinellose en Europe.







## 2.2 Coordination

J'assure la coordination de ce projet regroupant 10 participants pour une période de 3 ans. Une réunion de travail est organisée tous les 6 mois. L'essentiel du travail sera présenté à la 11<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur la Trichinellose en 2004 (USA) et au cours d'un symposium final réunissant les professionnels du secteur porcin et équin.

Le projet est divisé en 5 parties.

1 Sélection de souches européennes de *Trichinella* , comparer leur géotypes et phénotypes avec d'autres souches référencées.

2 Infections expérimentales chez le porc et le cheval pour préparer le matériel de référence et de sélectionner le muscles d'élection chez le cheval pour différentes espèces infestantes de *Trichinella*.

3 Epidémiologie descriptive de la Trichinellose équine en Roumanie. Quelles sont les origines de la contamination du cheval?

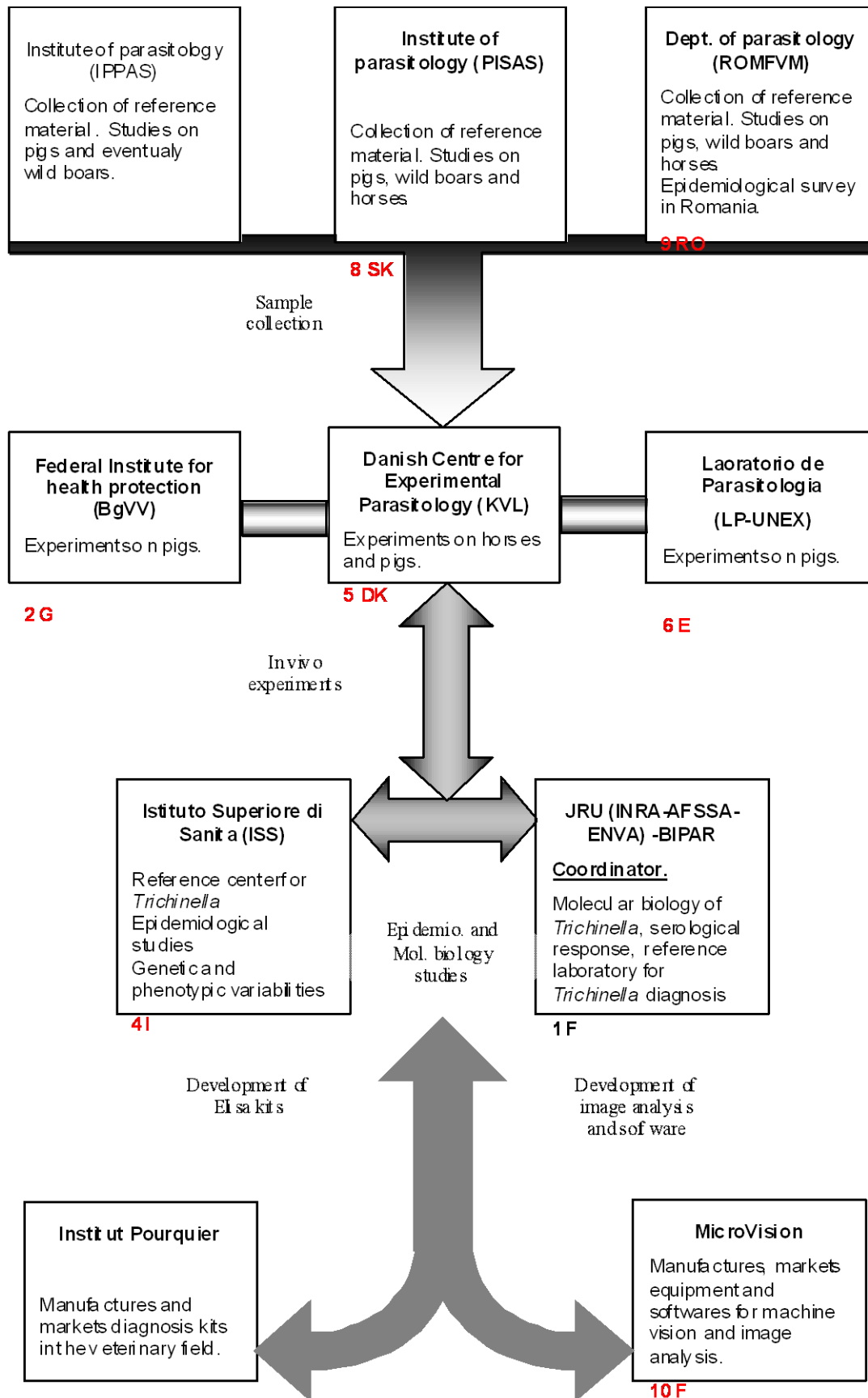
4 Développement d'un logiciel de reconnaissance de forme doté d'un système d'auto apprentissage

5 Caractériser des gènes spécifiques de stade et exprimer les parties immunodominantes pour développer un ELISA. Développer un ELISA capture à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des formes circulantes.

### Role des participants

Dix participants (Figure 09) appartenant à 8 pays européens différents sont associés dans ce contrat. Deux partenaires privés (Institut Pourquoi (France) et Microvision Instruments (France)) assurent le développement et la diffusion de produits validés (tests ELISA et logiciel de reconnaissance de forme). L'Istituto Superiore di Sanita (Italie) organise la collecte des souches de référence avec le Département de Parasitologie (Roumanie), l'institute of Parasitology (Pologne), l'Institute of Parasitology (PISAS) (Slovaquie) et organise l'étude épidémiologique en Roumanie. Les expérimentations animales sont réalisées au Danemark (Danish Center for Experimental Parasitology), en Allemagne (Federal Institute for health Protection) et en Espagne (Laboratorio de Parasitologia). Une grande partie du programme de biologie moléculaire est réalisée dans l'UMR BIPAR en association avec le partenaire polonais.

**Figure 09:** Diagramme décrivant les relations entre les différents partenaires du contrat TRICHIPORSE.



## **3 Réseau de Collaboration**

Le réseau de collaboration développé dans le cadre du développement de la recherche Trichine sera présenté au plan national et international

### **3.1 national**

Le laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Cochin (J Dupouy Camet) est le principal laboratoire avec lequel une collaboration de plusieurs années a été réalisée. Cette collaboration a eu comme point d'orgue l'organisation conjointe de la Xème Conférence Internationale sur la Trichine (ICT X) (Fontainebleau, 19-22 Août 2000) (annexe 02).

Le 2ème laboratoire français avec lequel nous avons des collaborations régulières est l'Unité de Biologie Moléculaire de l'AFSSA-Ploufragan qui s'est spécialisée dans le développement des vecteurs porcins et aviaires. Une demande d'action spécifique auprès du CNEVA(AFSSA) avait été faite en 1997.

Des collaborations plus ponctuelles avec d'autres laboratoires de l'AFSSA ou de l'INRA existent. Un contrat avec l'Office National de la Chasse (2000-2003) nous a permis d'effectuer pour la première fois à grande échelle la sérologie Trichine sanglier et le jus musculaire de viande chez cette espèce (Annexe 03).

J'ai obtenue également des relations contractualisées avec différentes PME

-Institut Pourquier : développement de l'ELISA précoce *Trichinella*, enquête sérologique dans la faune sauvage ( voir contrat européen TRICHIPORSE, et contrat AQS2000)

-Microvision instruments : développement d'un logiciel de reconnaissance de forme version 1 (contrat AQS 1999) et version 2 en cours de préparation avec système expert de mémorisation de formes (contrat TRICHIPORSE).

-SEPPIC : stimulation de la réponse muqueuse avec des adjuvants (contrat 3 ans renouvelable)

-EQUUS : importateur de viande de cheval en Europe (contrat AQS 1999).

### **3.2 Réseau de collaboration internationale contractualisé**

Les principales collaborations européennes nécessaires au programme Trichine sont décrites dans la Figure 08 et ont été intégrée dans le contrat TRICHIPORSE..

J'ai développé une action ECOS (n°: A01A03 faisant suite à l'action M96B03) avec le laboratoire de G. Ortega-Pierres (CINVESTAV, Mexico) et la laboratoire de A Enciso-Moreno et L Yopez (Centro Medico, Mexico). Ce contrat qui a une durée de 4 ans nous permet d'échanger 2 scientifiques chaque année ainsi que des étudiants en formation doctorale ou des post-doctorants pendant 6 mois (2 à 3 fois). Le laboratoire de G. Ortega-Pierres est impliqué dans la réaction immunitaire vis à vis de *Trichinella* et de *Giardia*. Le programme mastocyte a été initié avec cette équipe mexicaine.

J'ai préparé un contrat AFCRST (n° PRA BT-96-06) pour analyser la situation épidémiologique de la trichinellose en Chine et typer les isolats de *Trichinella* dans le Laboratoire de la Trichinellose du Dc Liu Mingyan. Ce contrat a été exceptionnellement prolongé une fois. L'ambassade de France en Chine nous a également attribué dans la suite de l'action PRA deux bourses de thèse pour des étudiants chinois et une bourse pour un post doctorant.

Enfin j'ai également développé une collaboration avec Y Takahashi (Department of Parasitology, Gifu University, School of Medecine, Japan) pour des études en microscopie electronique avec les anticorps monoclonaux que nous avons sélectionnés.

## BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

**Abraham S., and Malaviya R.** Minireview: Mast cells in infection and immunity. *Infection and Immunity* 1997, 65: 3501.

**Arizmendi-Puga, N., Casas N., Yépez-Mulia L. et al.** Activation of mast cells by *Trichinella spiralis* antigens through an IgE independent mechanism. In: Trichinellosis ICT9, editors : Ortega-Pierres G., Gamble H., van Knapen F. and Wakelin D, 1996 pp397-403.

**Bandi C., La Rosa G., Bardin M.G., Damiani G., Comincini S., Tasciotti L., Pozio E.** (1995) Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. *Parasitology*, **110**, 401-407.

**Bell RG.** The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Adv Parasitol.* 1998;41:149-217.

**Dei-Cas E, Cailliez JC & the members of the European Concerted Action on *Pneumocystis carinii*** (dont Ceré N, Coudert P, Guyot K, Mazars E, Polack B, Roux P). 1996. In vitro systems in *Pneumocystis* research. *Parasitol. Today* 12: 245-9.

**Delmas, B., Rasschaert, D., Godet, M., Gelfi, J., & Laude, H.** (1990). Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J. Gen. Virol.*, **71**, 1313-1323.

**Despommier DD** (1990) *Trichinella spiralis*: The worm that would be virus. *Parasitology Today* 6, 193-196

**Dupouy-Camet J** (2000) Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology.* 93, 191-200

**Hammond, M.P. & Bianco, A.E.** (1992). Genes and genomes of parasitic nematodes. *Parasitology Today* **8**, 299-305.

**Harrop, S.A., Prociv, P. & Brindley, P.J.** (1995). Amplification and characterization of cysteine proteinase genes from nematodes. *Tropical and Medical Parasitology* **46**, 119-122.

**Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS.** 1997. Typing of *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis* by PCR-SSCP of four genomic regions. *J. Euk. Microbiol.* 44: 16S.

**Kozak, M.** (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* **196**, 947-950.

**Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburrini E, Siracusano A, Guyot K, Nigou M, Roux P.** 1997. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J. Clin. Microbiol.* 35: 383-7

**Lee CH, Lu JJ, Bartlett MS, Durkin MM, Liu TH, Wang J, Juang B, Smith JW.** 1993. Nucleotid sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *J. Clin. Microbiol.* 31: 754-7.

**Lenstra, J.A., Kusters, J.G., Koch, G. & van der Zeijst** (1989). Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus. *Mol. Immunol.*, **26**, 7-15.

**Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, Leibowitz MJ, Lee CH.** 1994. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotid sequence variations on internal transcribed spacers of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2904-12.

**Marti H.P., Murrell K.D. & Gamble H.R.** (1987) - *Trichinella spiralis* : immunization of pigs with newborn larval antigens. *Exp. Parasitol.*, 63, 68-73.

**McMaster GK, Tratschin JD, Siegl G** (1981). Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. *J. Virol* 38. 368-371.

**Olsson M, Sukura A, Lindberg LA, Linder E.** 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scand. J. Infect. Dis.* 28: 279-82.

**Parkhouse RM and Ortega-Pierres G.** 19984. Stage-specific antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 623-630.

**Pozio E,** 1998. Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact. *Parasitology Today.* 14, 35-38.

**Reed AP, Jones EV, Miller TJ** (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol.* 62. 266-276.

**Rhode SL** (1985) III. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J virol.* 54. 630-633.

**Shin J.S, Gao Z, Abraham S.** 1999. Bacteria -host cell interaction mediated by cellular cholesterol/glycolipid-enriched microdomains. *Bioscience Reports*, 19, 421-432

**Skeiky Y.A.W., Benson D.R., Guderian J.A., Wittle J.A., Bacelar O., Carvalho E.M., Reed S.G.** (1995). Immune response of Leishmaniasis patients to Heat Shock Proteins of Leishmania Species and Humans. *Infection and Immunity*. 63, 4105-4114.

**Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ.** 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas and Trypanosoma and their medical and taxonomical consequences. *PNAS*, 87, 2414-2418.

**Wakefield AE, Stringer JR, Tamburrini E, Dei-Cas E.** 1998. Genetics, metabolism and host-specificity of *Pneumocystis carinii* *Med. Mycol.* 36: S1, 183-93.

**Wakefield AE.** 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1754-9.

**PARTIE 2**  
**CURRICULUM VITAE**

17/10/01

## **CURRICULUM VITAE**

### **Pascal BOIREAU**

Née le 6 Juin 1958 à Moulins

Marié, 4 enfants.

Service national effectué au Centre Sportif d'Equitation Militaire (Fontainebleau)

### **GRADE ET POSITION PROFESSIONNELLE ACTUELS :**

Inspecteur en Chef de Santé Publique Vétérinaire.

Mis à disposition du CNEVA puis de l'AFSSA depuis le 1er Janvier 1992.

Chef de l'Unité Parasitologie de l'AFSSA Alfort le 1/7/1998.

Directeur de l'UMR 956 INRA AFSSA ENVA depuis le 1/1/1999.

Extension de l'UMR 956 à l'Université Paris XII , le 1/02/2001

### **COORDONNEES PROFESSIONNELLES :**

UMR BIPAR, ENVA 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort.

ou

UMR BIPAR, AFSSA Alfort 22 rue Pierre Curie, BP 67, 94703 Maisons-Alfort.

tel: 33 1 49 77 13 00/33 1 49 77 13 28

Secrétariat : 33 1 43 96 71 26 (Mme Becret)

Télécopie: 33 1 49 77 13 16

e mail: p.boireau@vet-alfort.fr/ p.boireau@afssa.fr

### **COORDONNEES PERSONNELLES :**

2 rue des Platières, 91070 BONDOUFLE.

tel: 33 1 60 86 70 54/33 1 6 62 48 70 54

Email : Paboireau@aol.com

### **ETUDES ET DIPLOMES :**

- Thèse Université Paris VII Microbiologie: option virus animaux. soutenue le 30/10/1992. mention très honorable.

- Diplôme d'étude approfondie (option Virologie) PARIS VII (1987) mention B.

- Diplôme de Virologie Générale de l'Institut Pasteur (1987) mention TB.
- Maîtrise de biochimie (options virologie/biologie moléculaire des eucaryotes) 13 UV (PARIS VII) admis à la session de Juin 1986.
- Diplôme de Virologie Systématique de l'Institut Pasteur (1984). mention B
- Doctorat d'Etat Vétérinaire soutenu le 21 Décembre 1984. félicitations du Jury avec éloges
- Examen de fin de deuxième année de l'Ecole Nationale des Services Vétérinaires le 25 Juillet 1983.
- Baccalauréat C 1976, mention B

#### **STAGES PRATIQUES DE FORMATION :**

- Stage de 3 semaines au Centre d'élevage des animaux de laboratoire, CNRS à Orléans, la Source (1982). Sujet : Etude de la souris dystrophique de génotype dy/dy.
- Stage "Utilisation des radioisotopes en recherche biologique " CEA, Saclay, INSTN (Mai-Juin, 1985).
- Stage "Initiation aux techniques de clonage", PARIS VII, Septembre 1986.
- Stage "purification des protéines", Ecole de Chimie, Paris, Mai 1989.
- Stage "Bases Cellulaires de l'immunologie", PARIS VII, Mars 1993.
- Stage "Elimination des déchets au LAM" BioFormation, Octobre 1994
- Formation des Directeur d'unité à l'INRA (session de 10 jours sur une année en 2000).

#### **ACTIVITES PROFESSIONNELLES :**

##### 1°)Expertises

- Membre du Groupe d'expert Biotechnologie de l'AFSSA (nomination Septembre 2000)
- Membre de la commission de Génie Génétique . Représentant du Ministère de l'Agriculture (arrêté ministériel du 19 Décembre 1996, renouvelé en Mai 2000 ). (plus de 200 expertises réalisées).
- Groupe de travail européen " Trichinellose " (Décembre 1999-Mai 2000, Avril 2001). Elaboration d'un document préparatoire pour le contrôle des viandes porcines et chevalines dans la communauté européenne.
- Consultant à l'OIE pour le groupe de travail "Biotechnologie" depuis 1990.

- Membre de la commission de normalisation AFNOR domaine "Biotechnologie" depuis 1988. Participation à la rédaction de plusieurs normes.
- Membre de la commission de Génie Biomoléculaire de 1990 à 1998. (2 mandats). (plus de 130 expertises réalisées notamment en biotechnologie végétale)
- Rapporteur au Comité des Médicaments Vétérinaire des 2 premiers dossiers "Biotechnologie": Hormone de croissance Bovine (dossier Monsanto et Elly Lily) et vaccin Leucose féline (Virbac). Expert pour la partie Biotechnologie de ces deux dossiers.
- Membre du groupe de travail CEN TC 233 entre 1994-1997. "project leader" de la norme européenne "Liste des pathogènes animaux" dans le groupe de travail WG49.

### 2°) Activités de recherches

- Directeur de l'UMR 956 INRA AFSSA ENVA : 1<sup>er</sup> Janvier 1999. Extension de cette UMR à une quatrième tutelle (Université Paris XII) le 1/02/2001.
- Chef d'Unité Parasitologie du CNEVA Alfort: 1<sup>er</sup> Juillet 1998.
- Affectation dans l'unité de parasitologie au CNEVA-LCRV le 01/12/1992. Responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire Parasitaire de l'Unité Parasitologie du CNEVA.
- Travail de DEA et de Thèse sous la direction de J Laporte de 1986 à 1992 à la station de virologie et immunologie de l'INRA de Thiverval Grignon (1986-1988) puis de Jouy en Josas (1988-1992).
- Affectation dans le laboratoire de M Rémond (LCRV, service de virologie) du 01/12/1984 à 01/06/1986. Développement de réactifs immunologiques pour le diagnostic de la leucose féline et de la parvovirose du chien.

### 3°) Missions d'enseignement

- Membre du Conseil d'Administration du DEA Biologie , Génétique et Immunologie des Infections Parasitaires (2000-..)
- Responsable d'un module pour le certificat de Maîtrise " Physiopathologie des maladies transmissibles " Avril 2000, 2001.
- Formation des Techniciens des Services Vétérinaires, Directeur de laboratoire, Vétérinaires Inspecteurs depuis 1999. 3 sessions par an de 2 j. Les techniciens et les responsables des Services Vétérinaires ayant bloqué les premiers chevaux atteints de trichinellose avaient suivi cette formation.
- Cours au DESS "risques thérapeutiques" Hopital St Antoine depuis 1993-2000
- Cours de DEA Relation Hôte-Parasite. Participation à la journée spécialisée Trichine entre 1995 et 1998.
- Cours ENVA 4<sup>ème</sup> année: La recherche en Santé animale (1997) et divers cours spécialisés en parasitologie (les parasites des viandes) depuis 1998 dans le cadre d'un Certificat d'Etude Approfondie Vétérinaire à l'ENVA.
- Cours de virologie générale à l'Institut Pasteur "les coronavirus" 1990.
- Stage Pharmacie vétérinaire Mai 1990 "Les produits issus des biotechnologies".
- Direction de 26 stagiaires (durée de 5 semaines au moins, BTS, Maîtrise, License, étudiant vétérinaire) depuis 1984.

#### 4°) Missions liées directement à la DGAL

##### - *Mission pharmacie vétérinaire : 1984-1990*

1 Rapporteur à la commission d'AMM vétérinaire pour les produits biologiques de 1984 à 1990. Préparation de 60 commissions d'AMM pour la présentation des produits biologiques. Gestion administrative des 550 demandes d'AMM pendant la même période et préparation de plus de 800 fiches techniques de présentation pour la commission d'AMM. Membre du groupe pharmacopée " produits biologiques " et organisation des groupes de travail des laboratoires nationaux sur le contrôle des produits biologiques au cours de la même période.

2 Stage de formation des Techniciens des Services Vétérinaires à la réglementation et au contrôle des produits biologiques.

3 Harmonisation des contrôles des produits biologiques : 1986-1990 (environ 14 réunions ayant conduit à l'élaboration de différentes fiches permettant l'expertise des produits biologiques par les laboratoires nationaux devenus CNEVA)

-*Expertises en Biotechnologie/ biosécurité (produits biologiques dits de nouvelle génération) cf supra. (1991-..)* Nommé par le ministre de l'agriculture pour la Commission de Génie Biomoléculaire depuis 1991(plus de 2 mandats) et pour la Commission de Génie Génétique depuis 1996 (plus de 2 mandats).

##### □ *Responsable du Laboratoire National des Trichinelloses Animales (depuis le 1/07/1998)*

1 Enquête nationale du contrôle des trichinelloses animales et synthèse annuelle transmise

2 Simplification et optimisation des prélèvements à l'abattoir ; proposition de mesures de contrôle systématique pour le porc élevé en plein air (repris dans l'arrêté du 7 Septembre 2000).

3 Diagnostic de confirmation (2 chevaux saisis pour trichinellose depuis 1999 ; 4 prélèvements non confirmés depuis 1999) et de typage des souches de trichinellose, suivi épidémiologique terrain.

4 Formation des techniciens des laboratoires et services vétérinaires pour le contrôle des trichinelloses animales. Plus de 100 techniciens, 10 responsables de laboratoires et 20 responsables des services vétérinaires ont été formés en 2 ans et demi.

- *Responsable du laboratoire des babésioses équines pour l'exportation (depuis le 1/07/1998)*. Le test officiel pour les échanges internationaux des équidés (FC) est effectué pour 2500 prélèvements chaque année.

#### 6°) Missions directement liées au laboratoire d'accueil.

-Membre du conseil de laboratoire de 1984 à 1986 puis élu en 1993 jusqu'en 1997. Membre de droit en tant que chef d'unité en 1998.

-Représentant de l'administration en tant que membre titulaire du conseil hygiène sécurité central du CNEVA (1992-1998). Membre suppléant depuis 1999 pour le CHSC de l'AFSSA.

-Membre de la commission scientifique de l'AFSSA depuis Février 2001.

### **EXPERIENCES ACQUISE DANS D'AUTRES LABORATOIRES ET A L'ETRANGER:**

-Détaché entre 1986 et 1992 à la station de virologie Immunologie Moléculaire de l'INRA à Thiverval Grignon (1986-1988) puis à l'INRA de Jouy en Josas (1988-1992). DEA et Thèse

- University of Agriculture and Animal Science, Changchun, Chine. Septembre et Octobre 1997, Août 1999. Transfert technologique (Biologie moléculaire) et établissement d'un réseau de laboratoires pour le dépistage de la trichine en Chine.

-CINVESTAV de México: Mai 1998, Novembre 2000. Analyse de la réponse mastocytaire du rat et des lymphocytes intra-épithéliaux du porc à des antigènes de *Trichinella*.

### **PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES :**

**P19 – Liu Mingyuan , Zhu X.P., Xu K.C., Lu Q., Boireau P.** (2001) Biological and genetic characteristics of two *Trichinella* isolates in China; comparison with European species. *Parasite*. 8, S34-38

**P18 - Aucouturier J, Deville S, Perret C, Vallée I, Boireau P.** (2001) Assessment of efficacy and safety of various adjuvants formulations with a total soluble extract of *Trichinella spiralis*. *Parasite*. 8, S126-132

**P17 - Patrascu I. V., Gamble R., Sofronic-Milosavljevic L., Radulescu R., Andrei A., Ionescu V., Timocanu V., Boireau P., Cuperlovic K., Djordjevic M., Murrell D., Noeckler K, Pozio E.** (2001). The lateral flow card test : an alternative method for the detection of *Trichinella* infection in swine. *Parasite*. 8, S240-242

**P16 - Labat ML ., Pouchelet M., Gouhier N., Boireau P., Milhaud G .** (2001). Regulation by phagic T-lymphocytes of a (pluripotent?) organ stem cell present in adult human blood. A beneficial exception to self-tolerance. *Biomed and Pharmacother*. 55, 79-90.

**P15 - Boireau P , Vallée I, Roman T , Perret C, Fabien , JF , Liu Mingyuan, Gamble H.R., Gajadhar A** (2000) Horse trichinellosis: a low frequency for a high human risk. *Vet Parasitol*, 93, 309-320.

**P14 - Trap C, Boireau P** (2000). Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res*. 31. 461-471.

**P13 - Labat ML ., Milhaud G ., Pouchelet M., Boireau P.** (2000). On the track of a lauman circulating mesenchymat stem cell of neural crest origin. *Biomed and Pharmacother*. 54, 146-62.

**P12 - Vayssier M, F. Le Guerhier, J. F. Fabien, C. Vallet, H. Philippe, G Ortega-Pierres, C. Soulé, C. Perret, Liu Mingyuan, M Vega-Lopez, P Boireau.** (1999) Cloning and analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kDa. *Parasitology*. 119. 81-93.

**P9 - Boireau P., Vayssier M., Fabien J.F., Perret C., Calamel M., Soulé C.** (1997). Antigenic analysis of L1M of *Trichinella* T1 and T5 using 40 monoclonal antibodies: characterization of eleven antigenic groups and identification of new species markers. *Parasitology*. 115, 641-651.

**P8 - Boireau P, Fabien JF, Vayssier M., Perret C, Soule C et Vautherot JF** (1994). Obtention d'anticorps monoclonaux vis à vis des espèces *Trichinella spiralis* et *Trichinella* T5: leur utilisation comme marqueur d'espèces. *Vet. Res.* **25**, 606.

**P7 - Boireau P, Laporte J, Saulnier D, Madelaine MF, Vautherot JF.** (1993) Identification, expression in E coli and insect cells of the non structural proteins NS2 encoded by mRNA2 of Bovine Coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342:69-74.

**P6 - Rémond M. , Boireau P. , Lebreton F.,** 1992. Diagnosis of canine parvovirus disease by nucleic hybridization. *Archives of Virology* . 127. 257-269.

**P5 - Vautherot J.F., Laporte J., Boireau P.**(1992) Identification of an immunodominant epitope at the C terminal part of the S2 protein. *J. Gen. Virol.*,73, 3289-3294.

**P4 - Vautherot J.F.,M.F.Madelaine, Boireau P. Laporte J**(1992) Bovine coronavirus peplomer glycoproteins: detailed antigenic analyses of S1, S2 and HE. *Journal of General Virology*,73, 1725-1737.

**P3 - Boireau P., Crucière C. and Laporte J. ,** 1990. Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with the S proteins of two mouse hepatitis virus strains. *Journal of General Virology*, 71, 487-492.

**P2 - Woloszyn N. , Boireau P. and Laporte J. ,** 1990. Nucleotide sequence of the bovine enteric coronavirus BECV F15 mRNA 5 and mRNA 6 unique regions. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, Nø5, 1303.

**P1 - Savoysky E. , Boireau P. , Finance C. and Laporte J. ,** 1990. Sequence and analysis of BECV F15 matrix protein. *Res. Virol.*, 141, 411-425.

#### **ARTICLES SOUMIS OU EN CORRECTIONS APRÈS SOUMISSION**

- Liu Mingyuan , Boireau P. An Urgent Problem to be Solved: Trichinellosis Control in China – History and Present Situation of Human and Animal Infections. *Trends In Parasitology*.

-C. TRAP<sup>1</sup>, FU BAOQUAN<sup>1/2</sup>, D. LE RHUN<sup>1</sup>, LIU MINGYUAN<sup>2</sup>, T. ROMAND<sup>1</sup>, C. PERRET<sup>1</sup> and P. BOIREAU<sup>1</sup>. Cloning and analysis of a *Trichinella spiralis* serine protease gene. Article soumis à *Parasitology*. En correction

#### **PROCEEDINGS**

**X7 – Dupouy-Camet J, Boireau P., Murrell KD. (2001).** Highlights of the tenth International Conference on Trichinellosis: past and future. *Parasite*. 8, S7-9

**X6 - Boireau P., Wu Z., Fabien JF., Xu D., Sestier C., Liu M., Ortega-Pierre G., Takahashi Y.** (1998) Stage-specific epitopes of *Trichinella spiralis* and *Trichinella* T5. Proceedings of The IX international congress of Parasitology, ICOPAIX, Japan, August 1998, 1021-1025.

**X5 - Boireau P, Fabien JF, Le Guerhier F, Vayssier M, Perret C, Soulé C.** (1997) Detailed antigenic analysis of *Trichinella* T5 and T1 using monoclonal antibodies. *Trichinellosis*. 211-218

**X4 - Le Guerhier F, Trap C, Vayssier M, Fabien JF, Perret C, Soulé C, Boireau P.** (1997). cDNA cloning of the three antigenic stages of *Trichinella britovi*: establishing of stage specific probe. *Trichinellosis*. 287-292.

**X3 - Vayssier M, Fabien JF, Goutorbe PJ, Guilpain C, Vallet C, Soulé C, Boireau P.**(1997) Cloning, sequencing and expression of a cytoplasmic hsp70 of *Trichinella britovi*; its antigenicity in experimentally infected rabbit, mice and horses. *Trichinellosis*. 281-286.

**X2 - Perret C, Barrat J, Calamel M, Fabien JF, Boireau P, Soulé C** .(1997). Comparative humoral responses in a horse and a fox infected and reinfected with *Trichinella*. *Trichinellosis*.307-312.

**X1 - Boireau P. , Woloszyn N. , Crucière C. , Savoysky E. and Laporte J. ,** 1990. Sequence analysis of 8,7 Kb of BECV genome. "Coronaviruses and their diseases", 81-88.

#### **PUBLICATIONS DANS DES REVUES TECHNIQUES/NATIONALES**

**T12- Boireau P., LIU Mingyuan, Niborski V., Roman T., Vallée I.** (2001). Outils de la biologie moléculaire appliqués à l'épidémiologie des trichinelloses animales. *Journal AEEMA*. Sous presse.

**T11- Boireau P et Vallée I.** (2001). Les trichinelloses animales : épidémiologie et conséquences pour le contrôle des viandes. *Journal d'épidémiologie de l'AFSSA* , 1. 2-3.

**T10- Boireau P., Perret C., Fabien J.F.** (1999) La trichinellose: une zoonose parasitaire persistante. *Journal de l'académie vétérinaire*.72, 105-114.

**T9- Touratier I, Boireau P, Dupouy-Camet J, Pages JP.** (1999). La trichinellose du cheval et son importance en santé publique vétérinaire. *Faits et conséquence*. *Bull.Soc.Vet.Prat.* T83, 4. 223-264.

**T8- Boireau P** (1998) Evaluation des risques générés par un OGM. *HS Viandes et produits carnés*. 1-2 Octobre 1998. 8p.

**T7 -Liu Mingyuan, Xu Kecheng, Song Mingxin, P Boireau, JF Fabien, C Soulé.** (1998). Species identification of *Trichinella* isolate SW of Chinese cat. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*. 28, 7. 8-9.

**T6 -Liu Mingyuan, Xu Kecheng, Song Mingxin, P Boireau, JF Fabien, C Trap, M Vayssier, C Vallet, C Soulé.** (1998). Establishing and screening the cDNA libraries of

Adult and New born larvae of Chinese *Trichinella* isolates. Chinese Journal of Veterinary Science. 18, 2. 147-150.

**T5-Dupouy-Camet J, Ancelle T, Fourestié V, Boireau P, Soulé C.** (1998). Trichinelloses. *Encycl. Méd Chir* (Elsevier Paris) Maladies infectieuses, 8-517-A-10, 11p.

**T4- Moutou F, Boireau P.** (1997). Biotechnologies, de quoi s'agit-il?, *Journal des Mines*. Avril. 11-15.

**T3- Boireau P.** 1988. Recommandation concernant la préparation et certains aspects du contrôle des produits biologiques à usage vétérinaire. Considérations sur la préparation et le contrôle des médicaments vétérinaires issus de la biotechnologie. *Bull.Lab.Vet.*, 29/30. 4-20p.

**T2- Boireau P.** (1987) Le Bromure d'éthidium; utilisation, destruction, décontamination. *Bull.Lab.Vet.*, 26.71-73.

**T1- Boireau P, Remond M., Blancou J.** (1987). Recommandations applicables dans les laboratoires nationaux des services vétérinaires en matière de sécurité de manipulation de produits biologiques. *Bull. Lab. Vet.* . 27/28. 1-14.

### **MEMOIRES DE THESE/DEA**

**M3 Boireau P.** (1992). Contribution à l'étude du coronavirus bovin: identification des gènes des glycoprotéines HE et S, et d'une protéine non-structurale NS2. Analyse de leur rôle biologique et localisation d'un épitope immunodominant continu de S. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VII. 183p.

**M2 Boireau P.** (1986). Clonage et séquençage du gène codant pour la glycoprotéine S du coronavirus entérique bovin. Mémoire de DEA Université Paris VII. 32p.

**M1 Boireau P.** (1984). Les myopathies héréditaires des mammifères et oiseaux; étude bibliographiques. Thèse de doctorat vétérinaire. 121p.

### **EDITIONS DE PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES/ EVALUATION ARTICLES**

1) Membre du bureau de la revue Veterinary Research (depuis 1999)

#### **2) Co direction d'un ouvrage**

**E1-Supplément n°2 Parasite** Juin 2001, volume8. Xth International Conference on Trichinellosis 20-24 august 2000, S1-S296. editors: J Dupouy Camet and P Boireau.

#### **3) Publications de l'OIE:**

Analyse et synthèse avec rédaction de la base de données de l'OIE concernant les méthodes issues des biotechnologies et applicables au diagnostic des maladies animales, à leur prophylaxie médicale, à leur contrôle génétique et aux recherches associées.

Publication dans la "Lettre d'information sur la biotechnologie vétérinaire".

**O1-** vol1, 1991 13-63

**O2-** vol2, 1992 13-75

**O3-** Vol3, 1993 13-88

**O4-** Vol4, 1994 13-111.

Analyse des besoins pour informatiser l'analyse de la collecte des données.

**O5-** Vol5, 1995 actualisation sur disquette.

**O6-** Première édition vétérinaire sous cette forme disponible sous [www.oie.int](http://www.oie.int)

4) Activité d'expertise d'articles avant publication (« Referee »)

-Veterinary Research(1), Parasite (2), Int J of Parasitology (2), Parasitology (2), OIE Publications (3).

### **OUVRAGE TRADUIT:**

"Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees". Edition OIE. 1996, 550p. (avec la collaboration d' Elisabeth Boireau).

### **RAPPORTS :**

#### **1)Rapports liés à une mission**

Boireau P et Sofronic.L. 2001. Rapport sur le cheval 09 reconnu comme atteint de Trichinellose le 19/03/2001 et soumis à la destruction conformément à l'arrêté du 17 mars 1992. Rapport d'enquête DGAL, 8p.

Boireau. P. 1999. Premier cheval bloqué an France pour trichinellose confirmée. rapport d'enquête DGAL, 6p.

Boireau P et Fabien JF. 2000 Rapport annuel du contrôle des trichinelloses animales en France 1999. 4p.

Boireau P et Fabien JF. 2001 Rapport annuel du contrôle des trichinelloses animales en France 2000. 6p.

#### **2) Rapports liés à des contrats de recherche**

- Boireau P et Liu Mingyuan. 1998. Rapport fin Contrat AFCRST. 1996 "Biotechnology" PRA 96-06. 19p.

- Boireau P, Chermette R, Lev D, Boulouis HJ. 1998. Demande de labellisation de l'UMR Biologie Moléculaire et Immunologie Parasitaires et Fongiques. 62p.

- Boireau P et Ortega Pierres G . 2001.Rapport fin Contrat ECOS-ANUIS 1996 M96B03., 45p.

- Boireau P. 2001Rapport de fin d'étude : Programme national de surveillance sérologique des sangliers sauvages 2000-2001. Sérologie Trichine . 15p.

- Boireau P, 2001. Convention UMR BIPAR 30p

- Boireau P et Huin M. 2001. Rapport d'étape contrat AQS A 2569.15p.

- Boireau P. 2001. Rapport d'étape contrat AQS A 2589. 52p.

#### **3) Rapports liés au travail de commissions**

- Rapports de présentation à la commission d'AMM : plus de 500 rapports sur les sérums et vaccins vétérinaires. 5 rapports d'expertises réalisés en plus des fiches de synthèse.

-Présentation de rapports d'expertise à la CGBM : plus de 120 dont 5 concernant les vaccins/produits vétérinaires et au moins 115 les plantes transgéniques.

-Présentation de rapports d'expertise à la CGG: plus de 100 concernant essentiellement le classement d'OGM en matière d'expérimentation animale.

#### **PRESENTATIONS A DES CONGRES :**

**C53-Vallée I, Lainé V, Cote M, Gagliardo L, Niborski V, Appleton J, Boireau P. (2001).** Invasion des cellules épithéliales intestinales murines par *Trichinella spiralis* : modèle *in vitro*. Société Française d'Immunologie/Société Francophone de Transplantation Paris Institut Pasteur, 21-23 novembre 2001(P). p144

**C52 - Niborski V, Vallée I, Fonseca R, Enciso-Moreno A, Ortega Pierres G, Boireau P, Yopez-Mulia L. (2001) .** Activation des mastocytes de rat par les antigènes de *Trichinella spiralis*. Société Française d'Immunologie/Société Francophone de Transplantation Paris Institut Pasteur, 21-23 novembre 2001(P). p116

**C51 – Sofronic –Milosavljevi, Vallée I, Boireau P. (2001).** Experimental trichinellosis : B1 lymphocyte involvement in local immune response to parasite. 3rd balcan Congress of immunology. 31 october-1-3 november. (O).

**C50- Maillard R, Bouillin C, Gandouin C, Vayssier-Taussat M, Perez-Eid C, Boireau P, Boulouis HJ. (2001)** Bases épidémiologiques de l'(infection à bartonelle chez les bovins. Les Bio-Sciences" à l'Université Paris 12. 26 Octobre 2001 (P).

**C 49- Niborski V, Vallée I, Fonseca R, Enciso-Moreno A, Ortega Pierres G, Boireau P, Yopez-Mulia L. (2001) .** Variation de la synthèse d'ARNm codant pour des interleukines chez les mastocytes de rat stimulés par des antigènes de *Trichinella spiralis*. Les Bio-Sciences" à l'Université Paris 12. 26 Octobre 2001 (P).

**C48 - Demanche C, Wanert F , Herrenschmidt N, Berthelemy M , Roux P, Dei-Cas E, Polack B, Boireau P, Chermette R et Guillot J (2001)** Circulation de *Pneumocystis carinii* dans une colonie de macaques ; Bases épidémiologiques de la pneumocystose. Les Bio-Sciences" à l'Université Paris 12. 26 Octobre 2001 (P).

**C47 Aucouturier J, Deville S, Perret C, Boireau P. (2001)** Efficacy and safety of various adjuvants formulations with a total soluble extract of *trichinella spiralis*. "Les Bio-Sciences" à l'Université Paris 12. 26 Octobre 2001 (P).

**C46 - Niborski V, Vallée I, Fonseca R, Enciso-Moreno A, Ortega Pierres G, Boireau P, Yopez-Mulia L. (2001) .** Variations dans la synthèse d'ARNm codant pour les interleukines chez les mastocytes de rat stimulés par les antigènes de *Trichinella spiralis*. Réseau pour l'étude de la biodiversité des nématodes et des helminthes. Paris 17-19 septembre 2001. (P) p43.

**C45 - Vallée I , Lainé V, Cote M, Gagliardo L, Niborski V, Appleton J, Boireau P (2001)** Invasion des celules épithéliales intestinales par *trichinella spiralis* : modèle *in vitro*. Réseau pour l'étude de la biodiversité des nématodes et des helminthes. Paris 17-19 septembre 2001. (animation video)(O)

**C44 - Niborski V, Fonseca R, Enciso-Moreno A, Ortega Pierres G, Boireau P, Yopez-Mulia L. (2001) .**Changes in mRNA expression of mast cells interleukins induced by *Trichinella spiralis* antigens. 11th International Congress of Immunology. (P). p83

**C43 - Boireau P., LIU Mingyuan, Niborski V., Roman T., Vallée I. (2001).** Outils de la biologie moléculaire appliqués à l'épidémiologie des trichinelloses animales. Journée AEEMA. 17-18 Mai, Ecole Vétérinaire d'Alfort.(O, invité)

- C42 -Trap C, Mingyuan L, Le Rhun D, Perret C, Boireau P.**(2000) Cloning and characterisation of a serine protease of *Trichinella spiralis*. *Acta Parasitologica* 45, (3) 195 (O)
- C41 -Andiva S., Perret C, Haeghebaert S., Tourte-Schaeffer C., Magnaval J.F., Boireau P, Dupouy –Camet J. (2000)** Evaluation of a Western blot kit in the diagnosis of human trichinellosis. *Acta Parasitologica* 45, (3) 231-232 (O)
- C40 -Perret C, Barrat J., Cojean S., Ziari M., Boireau P.**(2000) Longitudinal analysis of the humoral immune response of foxes experimentally infected with *Trichinella britovi*. *Acta Parasitologica* 45, (3) 235 (P)
- C39 - Patrascu I. V., Gamble R., Sofronic-Milosavljevic L., Radulescu R., Andrei A., Ionescu V., Timocanu V., Boireau P., Cuperlovic K., Djordjevic M., Murrell D., Noeckler K, Pozio E. (2000).** The lateral flow card test : an alternative method for the detection of *Trichinella* infection in swine. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August(P)
- C38 - Patricia B. GARCÍA-REYNA1 Pascal BOIREAU, Chengyao LI, Fernando RUÍZ-PÉREZ, Araceli E. SANTIAGO-MACHUCA, César GONZÁLEZ-BONILLA, and Guadalupe ORTEGA-PIERRES.**(2000). Cloning and expression of an adult stage-specific gene from *Trichinella spiralis*. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (P)
- C37 -Catherine. TRAP, Daniele LE RHUN, LIU MINGYUAN, Catherine PERRET et Pascal BOIREAU (2000).** Molecular cloning and analysis of a common stage *Trichinella spiralis* serine protease gene. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (P)
- C36-Liu Mingyuan and Boireau P (2000).** Trichinellosis in China. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (O, Invited lecture)
- C35 -Boireau P (2000).** Stage specific antigens of *Trichinella* ICT 10<sup>th</sup> 20-24 Fontainebleau, August (O)
- C34 -Catherine Perret, Violeta Niborsky, Jacques Ducos de Lahitte, Isabelle Vallee, Jean Dupouy-Camet, Claude Soule, Pascal Boireau (2000).** Role of domestic carnivorous as "sentry" animal during human trichinellosis outbreaks. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (P)
- C33 -Patricia B. Garcia-Reyna, Lilian Yepes-Mulia, Jean Francois Fabien, Pascal Boireau And Guadalupe Ortega-Pierres. (2000).** Identification of *Trichinella spiralis* antigens recognized by antibodies produced by intestinal explants obtained from mice infected with this parasite. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (O invited lecture)
- C32 -Aucouturier J, Deville S, Perret C, Boireau P.(2000)** . Assessment of efficacy and safety of various adjuvants formulations with a total soluble extract of *Trichinella spiralis*. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (P)
- C31 - Andiva S, Perret C, Haeghebaert S, Tourte-Schaeffer C, Magnaval J-F, Sun Xin, Boireau P, Dupouy-Camet J. (2000).** Evaluation of "trichinella Western blot IgG" kit in the diagnosis of human trichinellosis. ICT 10<sup>th</sup> Fontainebleau, 20-24 August (P)
- C30 - Trap C, Liu Mingyuan, Le Rhun D, Perret C , Boireau P . (2000).** Clonage , séquençage et expression d'un gène codant pour une sérine protéase de *Trichinella spiralis*. Montpellier, Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie. Mars (O)
- C29 - Liu Mingyuan and Boireau P . (2000).** Montpellier, Congrès annuel de la Société Française de Parasitologie. Mars (O)
- C28 - Trap C, Liu Mingyuan, Le Rhun D, Perret C, Boireau P. (1999).** Cloning, sequencing and expression of a *Trichinella spiralis* serine protease gene., Eight International Helminthological symposium. Kosice, Slovak Republic, September 28-October 1. *Helminthologia*, 36, suppl., 3-L5, p28-29. (O)

**C27 - Trap C, Niborski V, Perret C, Ducos de Lahitte, J, Carrouée O, Liu Mingyuan, Boireau P. (1999).** Domestic Carnivorous are sentry animal during human trichinellosis outbreaks., Eight International Helminthological symposium. Kosice, Slovak Republic, September 28-October 1. Helminthologia, 36, suppl., 5-L8, p46 (P).

**C26 - Trap C, Niborski V, Femenia F, Garcia-Reyna P, Cote M, Le Rhun D, Beugnet F, Ortega Pierres G, Boireau P. (1999).** Cinétique de la production d'immunoglobulines dans le duodénum et le jéjuno-ileum de la souris infestée par *Trichinella spiralis*. Immunité Muqueuse, Département Santé Animale INRA, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 10-11 Juin.(O).

**C25 - Labat ML ., Milhaud G ., Pouchelet M., Boireau P. (1999).** On the neural crest origin of a circulating monocytoid cell able in transdifferentiate into cells of the stromal pool. Journal of bone and mineral research. Program and abstracts. Twenty-first annual meeting of the American society for bone and mineral research. St Louis, Missouri, USA, September 30-October 4. pS316. (P).

**C24 - Boireau P, Wu Z, Fabien JF, Sestier C, Liu M, Soulé C, Takahashi, Y. (1998)** Epitope stage and species specific inside *Trichinella* genus. IX international congress of Parasitology, ICOPAIX, Japan, August 1998. (O).

**C23 - Liu Mingyuan, Sauzeau K., Xu Kecheng, Trap C., Li Chengyao, Garcia-Reyna P., Perret C., Soulé C. , Boireau P. (1998).** Genetic variability in *Trichinella* genus: comparison of chinese *T spiralis* and *T nativa* isolates with aN european *T. spiralis* strain. IX international congress of Parasitology, ICOPAIX, Japan, August 1998. (P).

**C22 - Perret C, Vallet C, Fabien JF, Boireau P, Soulé C.** Circulating new born larvae are an early marker of *Trichinella spiralis* horse infection. IX international congress of Parasitology, ICOPAIX, Japan, August 1998. (P).

**C21 - Trap C., Liu Mingyuan, Perret C., Soulé C., Boireau P . (1998).** Cloning, sequencing and expression of a *Trichinella spiralis* serine protease gene. IX international congress of Parasitology, ICOPAIX, Japan, August 1998. (P).

**C20 – Mingyuan Liu, Sauzeau C, Xu Kecheng, Trap C., Li Chengyao, Garcia-Reyna P, Perret C, Soulé C, Boireau P. (1997).** Genetic variability in *Trichinella* genus; comparison of Chinese *T spiralis* and *T nativa* isolates with European isolates. Réunion d'hiver de la Société Française de Parasitologie. Paris (France). (P).

**C19 - Fabien J.F., Vayssier M., Perret C., Vallet C., Soulé C., Boireau P. (1997).** Les antigènes cuticulaires du stade L1 musculaire de *Trichinella*. Réunion d'hiver de la Société Française de Parasitologie. Paris (France). (P).

**C18 - Boireau P., Le Guerhier F., Laurent D., Trap C., Vayssier M., Fabien J.F., Perret C., Soulé C. (1997).** Identification de marqueurs spécifiques de stade et d'espèce dans le genre *Trichinella*. Réunion d'hiver de la Société Française de Parasitologie. Paris (France).(O).

**C17 - Vayssier M., Fabien J.F., Soulé C., Boireau P. (1996).** Antigenicity of *Trichinella britovi* hsp70. VII European Multicollloquim of Parasitology. Parma (9 september Italy). (O).

**C16 - Boireau P., Vayssier M., Le Guerhier F., Fabien J.F, Soulé C. (1996).** Antigenic analysis of *Trichinella* T5 and T1 using 40 monoclonal antibodies. VII European Multicollloquim of Parasitology. Parma (9 September Italy).(P)

- C15- Boireau P, Fabien JF, Le Guerhier F, Vayssier M, Perret C, Soulé C.** (1996). Detailed antigenic analysis of *Trichinella* T5 and T1 using monoclonal antibodies. 9th International Conference on Trichinellosis. Mexico, 19-22 Aout 1996 (P)
- C14 - Le Guerhier F, Trap C, Vayssier M, Fabien JF, Perret C, Soulé C, Boireau P.** (1996). cDNA cloning of the three antigenic stages of *Trichinella britovi*: establishing of probe stage specific. 9th International Conference on Trichinellosis. Mexico, 19-22 Août 1996. (O)
- C13 - Vayssier M, Fabien JF, Goutorbe PJ, Guilpain C, Vallet C, Soulé C, Boireau P.**(1996). Cloning, sequencing and expression of a cytoplasmic hsp70 of *Trichinella britovi*; its antegenicity in experimentally infected rabbit, mice and horses. 9th International Conference on Trichinellosis. Mexico, 19-22 Août 1996. (O)
- C12 - Perret C, Barrat J, Calamel M, Fabien JF, Boireau P, Soulé C .** (1996). Comparative humoral responses in a horse and a fox infected and reinfected with *Trichinella*. 9th International Conference on Trichinellosis. Mexico, 19-22 Août 1996. (O)
- C11 - Vayssier M., Goutorbe P.J., Fabien J.F., Soule C., Boireau P.**(1995) Cloning of a HSP70 gene of *Trichinella britovi*. VII congrés européen de Biotechnologie, 22-24 Février Nice (France). (P)
- C10 - Vayssier M, Croizet D., Perret C., Fabien JF., Soulé C., Boireau P.** (1994). Clonage dans le vecteur lambda Zap II des ARNm de *Trichinella britovi*. Journée de Parasitologie vétérinaire, " Productivité, qualité des produits et parasitisme ". 9-10 Juin. Niort (France). (P)
- C9 - Boireau P, Fabien JF, Vayssier M., Perret C, , Soule C et Vautherot JF** (1994). Obtention d'anticorps monoclonaux vis-à-vis des espèces *Trichinella spiralis* et *Trichinella* T5: leur utilisation comme marqueur d'espèces. Symposium Outil de la biologie moléculaire en parasitologie. 23-25 Mars . Orléans.(France). (O)
- C8 - Boireau P, Fabien JF, Perret C, Vautherot JF Calamel C Soule C.** (1993) Obtention of Monoclonal antibodies against *Trichinella spiralis*: Their use in immunoblot analysis of soluble antigen. Eighth International Conference on Trichinellosis. 7-10 Septembre. Orvieto (Italie) No abstract P27. (P)
- C7 - Boireau P, Laporte J, Saulnier D, Madelaine MF, Vautherot JF.** (1992) Identification, expression in E coli and insect cells of the non structural proteins NS2 encoded by mRNA2 of Bovine Coronavirus."Fifth International Coronavirus Symposium" (Septembre 12-16, Chantilly, France) (O)
- C6 - Boireau P, Vautherot JF, Madelaine MF, Woloszyn N, Laporte J** (1991) Identification, Expression in E coli and Purification of non structural Protein NS2 encoded by mRNA2 of Bovine enteric coronavirus (BCV). Second Congress of the European Society for Veterinary Virology. "The pathogenesis of viral diseases". September 23-26 Uppsala (Suède). (O)
- C5 - Woloszyn N, Boireau P, Vautherot JF, Madeleine MF, Laporte J.** (1990) Biological role of the non structural proteins NS1, NS2 and NS3 of Bovine Coronavirus. VIIth International Congress of Virology. Berlin . No abstract 6028. (P)
- C4 - Remond M, Boireau P and Lebreton F** (1990). Diagnosis of canine parvovirus disease by nucleic acid hybridization. VIIth International Congress of Virology. Berlin . No abstract 1981. (P)
- C3 - Boireau P., Crucières C. Laporte L.** 1989, Séquence et analyse du génome du Coronavirus entéritique bovin. séquence du gène codant pour la glycoprotéine S.

Analyse de la structure primaire de la protéine. Journée CNEVA/INRA. 3 Février. Maisons Alfort. (O)

**C2 - Boireau P., Woloszyn N. Crucières C. Savoysky E. Laporte L.** 1989, Cloning and sequencing of BCV spike gene. "Fourth International Symposium on Coronaviruses" July 26-31, Cambridge, UK (O)

**C1 - Boireau P. et Laporte J.** (1987) Séquence et analyse des gènes du coronavirus entérique bovin. II: Séquence partielle du gène codant pour la glycoprotéine de spicule E. Journée d'Automne d'information scientifique du centre de recherches de Jouy en Josas. 15 Octobre 1987. (P)

### **SEMINAIRES ET INVITATIONS A DES CONGRES.**

**S9-** Boireau P et Vallée I. interrelations entre les gènes de développement et leur rôle dans la virulence chez *Trichinella*. Réseau pour l'étude de la biodiversité des nématodes et des helminthes. Paris 18 septembre 2001. (p27-28)

**S8-** From Genes to Antigens of *Trichinella*: go and return. El Departamento de Genetica y Biologia Molecular. Mexico, 14 Novembre 2000.

**S7-** Antigenic analysis of *Trichinella*. Seminario del INDRE, may 19TH 1998. Mexico

**S6-** Stage specific epitopes of *Trichinella* and gene flow inside *Trichinella* genus. CENID-MICROBIOLOGIA, INIFAP-SAGAR. May, 22nd 1998, Mexico.

**S5-** Stage and species specific epitopes in *Trichinella* genus. Departamento De genetica y biologia Molecular, CINVESTAV. 12 de mayo de 1998, Mexico.

**S4-** Stage specific gene and stage specific epitopes of *Trichinella*. Hospital de Pediatria 2do. Piso, Centro Medico Nacional Siglo XXI. May 26th 1998, Mexico.

**S3-** Antigènes de stade et d'espèce dans le genre *Trichinella*. Conférence dans le cadre de la société française de Parasitologie. 8-9 Decembre 1997. UFR Cochin Port Royal.

**S2-** Antigenic mapping of *Trichinella* 1997. Changchun University of Animal Sciences. Changchun, China. october 18.

**S1-** Assessment criteria for Determining Environmental Safety of plants with viral resistance. (1994). 3rd Joint EC/US workshop on releases of transgenic plants. Bruxelles , June 10-11 (invitation en tant que membre de la CGBM).

### **CONFERENCE ET TABLE RONDE A CARACTERE TECHNIQUE:**

**Si4-** Du champ à l'assiette : *Trichinella*. Espace Recherche du Salon de l'Agriculture, Mars 1999.

**Si3-** Les organismes génétiquement modifiés. Biologie et sécurité alimentaire. Que nous réserve l'avenir? Soirée Pays de Rance. Mardi 28 Avril 1998. (Participation de P Vannier et JP Tillon).

**Si2-** OGM et environnement; évaluation des risques. Espace Recherche du Salon de l'Agriculture, Samedi 7 Mars 1998. (Participation de A Weil, P Joudrier, G Pascal). Casette vidéo " OGM et alimentation ", série: Produire, nourrir, préserver l'environnement dialogues avec des scientifiques. INRA, 102mn.

**Si1-** Comment préserver la biodiversité et les manipulations génétiques. Les Mardis de l'environnement , MP Cabello, Sucremont. Mardi 8 Avril 1997. (Participation de P Guy, P Ricard, JC Perez).

## **PARTICIPATION A LA REDACTION DE NORMES OU OUVRAGES DE TYPE NORMATIF OU REGLEMENTAIRE:**

### 1 Comme rédacteur principal :

Normes Françaises :

X42 075 : Guide de bonne pratique dans l'utilisation des micro organismes pathogènes pour les animaux.

X42 208 :

Normes Européennes :

-Norme CEN CR 12894/1997. Reprise dans la norme AFNOR X42-208 Rapport sur le classement des pathogènes animaux.

Définitions :

-Des classes de microorganismes pathogènes animaux en 4 groupes. Cette définition a été reprise dans différentes normes et réglementation depuis 1988.

-Auto-vaccin : définition proposée et reprise dans le décret sur la pharmacie vétérinaire de 1986.

### 2 Document résultant d'un travail collectif :

- Principes de classement et guides officiels de la commission de génie génétique (2001). Ministère de la Recherche. 101p. Disponible sur le site Internet du ministère de la recherche :

<http://www.recherche.gouv.fr/commiss/genetique/default.htm>.

- Norme X42070 : Guide de bonne pratique dans l'utilisation des micro organismes pathogènes pour l'homme.

- Norme X42072 : Guide de bonne pratique dans l'utilisation des micro organismes pathogènes dans l'industrie.

- Participation au groupe de travail ayant abouti à la rédaction de l'arrêté du 13/08/1996 concernant la protection du travailleur dans les laboratoires manipulant les pathogènes.

### **THESE/DEA dirigés:**

-**Catherine Trap**. La virulence dans le genre *Trichinella*: rôle des cystéines protéases. Thèse Paris XII soutenue le 6 Juin 2001. Très honorable

-**Jean François Fabien**. Analyse antigénique de trois stades du parasite *Trichinella sp.* à l'aide d'anticorps monoclonaux. Thèse EPHE en préparation.

-**Violeta Niborski**. DEA "Interaction hôtes-parasites". Paris XII. 1999. mention AB.

-**Muriele Vayssier**. Caractérisation antigénique des larves L1 musculaires de *Trichinella* à l'aide d'anticorps monoclonaux; clonage, séquençage et expression d'un gène codant pour une protéine antigénique: l'HSP70 cytoplasmique. Thèse Lyon I soutenue le 7/5/1997. Félicitations du jury

-**Catherine Trap**: Etude de la variabilité génique dans le genre *Trichinella*. Expression différentielle de gènes au cours du développement de l'espèce *Trichinella britovi*. DEA "Interaction hôtes-parasites". Paris XII. 1996. mention AB

-**Franç Le Guerhier**. Etablissement de la première banque d'ADNc du stade adulte de *Trichinella britovi* et étude comparée des stades antigéniques adulte et L1 musculaire du parasite. DEA Virologie, Paris VII, mention B.

**-Nathalie Woloszyn.** Détermination de la séquence nucléotidique et expression en systèmes procaryote et eucaryote de 2 gènes non structuraux du coronavirus entérique bovin (BECV). DEA Virologie fondamentale, Paris VII, 1990. mention B. En co-direction avec J Laporte.

#### **THESE D'EXERCICE dirigée :**

**-Audrey Guillemet.** Etude descriptive et critique de la réglementation concernant la recherche de trichines en France. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur Vétérinaire. Faculté de médecine de Nantes, 25 septembre 2001. Très honorable avec Félicitation du jury et échanges avec facultés étrangères.

**-Radu Blaga.** Studiul dinamicii anticorpilor si influenta dozi administrate la soareci of 1 infestati experimental cu *Trichinella spiralis*. Thèse pour le diplôme de Vétérinaire de la faculté vétérinaire de Cluj-Napoca (Roumanie). Janvier 2002

#### **AUTRES ETUDIANTS DIRIGES:**

- **Karine Sauzeau** (1997): Réalisation des banques d'ADNc des stades adulte/L1NN de *T. spiralis* et de *T. nativa* (souches chinoises). BTS Biochimie, Lycée Uruguay-France de Fontainebleau. 47p

- **Frédéric Richard** (1997): Rapport bibliographique: la trichinellose. rapport de maîtrise, option biologie, Université d'Orléans. 21p.

- **Foata Francis.** (1997) Etablissement de la première banque d'ADNc de *Trichinella spiralis*, stade Adulte J3-J5/L1NN et de *Trichinella nativa*, stade L1M. Rapport pour l'obtention du Brevet de Technicien Supérieur Biotechnologie (2ème année). 42p

- **Laurent David.** (1997). Clonage des ARNm de *Trichinella nelsoni* (stade L1M). Rapport de stage pour l'obtention du brevet de Technicien Supérieur Agricole ANABIOTEC. 40p.

- **Guilpain Christelle.** (1996) Purification des ARN du stade L1 nouveau-née de *Trichinella britovi* et étude comparée des stades antigéniques adulte et L1 musculaire de ce parasite. Rapport de stage pour l'obtention du brevet de Technicien Supérieur Agricole ANABIOTEC. 48p.

- **Durenceau Samantha.** (1996) Clonage d'un gène *hsp 70* de *Trichinella britovi* dans le plasmide pBCAT. Rapport de stage de 2ème année ENVA.32p.

- **Foata Francis.** (1996) Identification d'un gène codant pour une protéine de choc thermique de 70kDa de *Trichinella pseudospiralis*. Rapport pour l'obtention du Brevet de Technicien Supérieur Biotechnologie (1ère année). 42p

- **Pierre -Jérôme Goutorbe.** (1995) Clonage et analyse d'un gène *hsp 70* de *Trichinella britovi* 30p. Brevet de Technicien Supérieur Agricole ANABIOTEC. 40p.

- **Emmanuelle Vaché** (1995) Clonage dans M13 et séquençage du gène codant pour la protéine *hsp 70* de *Trichinella britovi*. Stage DEUG initiation à la recherche Université Paris VII. 40p

#### **PARTICIPATION À DES JURYS/EVALUATION SCIENTIFIQUES**

- **Thèse de Doctorat d'Université (en dehors de thèses dirigés comme rapporteur)**

- **Denis Saulnier** : 1996. Contribution à la caractérisation antigénique biochimique et moléculaire du parasite non classé responsable de la néphrite interstitielle hyperplasique des salmonidés. Paris VI.
- **Meryem Ouarzane** : 1998. Etude des premiers stades de développement de la coccidie aviaire Eimeria tenella: clonage et expression de gènes de schizontes primaires. Versailles
- **Hervé Pascalis** : 1998. Clonage et caractérisation de molécules défectives interférentes (DI) chez le virus de la gastro entérite transmissible du porc (TGEV). Paris VII Denis Diderot. Option virologie fondamentale.
- **Athman Haffar** : 1999 Etude de la protéine de matrice M du virus de la Peste des Petits Ruminants. Clonage, séquençage et expression dans le système baculovirus. Paris VI

## **2)Membre de Jury de Concours**

### **INRA :**

- Recrutement IE octobre 1999 (écrit et oral). Tours Nouzilly
- Recrutement ASC septembre 2000 (écrit et oral) . Paris
- Recrutement CR2/CR1 avril-mai 2001 (écrit et oral) . Paris
- Recrutement DR2 octobre novembre 2001(écrit et oral). Paris

### **AFSSA**

- Recrutement CR1/CR2 Mai 2001. Maisons Alfort

## **3) Unité/institut.Comme membre de la commission d'évaluation ou du comité scientifique**

- Conseil scientifique de l'IFR barrière d'espèce Tours/Nouzilly septembre 1998
- Evaluation du Département CIRAD Octobre 1999
- Unité PAP INRA Tours Novembre 2000.

## **4)Commission d'évaluation**

- Jury de sélection des lauréats des meilleurs travaux de jeunes scientifiques (EMOP, Poznam, septembre 2000).
- Membre de la commission scientifique spécialisée de l'AFSSA 2001-

## **5) Expertises scientifiques**

- évaluation du dossier unité URA INRA 955 (1996)
- évaluation de projets scientifiques soutenus par les harras nationaux (2000).

## **BOURSES, CONTRATS DE RECHERCHE:**

- 1 Bourse du Ministère des Affaires Etrangères pour participer au congrès , "Fourth International Symposium on Coronaviruses" July 26-31, Cambridge, UK. 1987**
- 2 Bourse du Ministère des Affaires Etrangères pour participer au congrès , "Second Congress of the European Society for Veterinary Virology. "The pathogenesis of viral diseases". September 23-26 Uppsala (Suède) ». 1991**
- 3 Bourse de thèse CNEVA . M Vayssier 1994-1997.**

**4 Bourses de DEA et Thèse CNEVA C Trap. 1996-2000**

**5 - Contrat ECOS-ANUIS 1996 M96B03.** Cloning and expression of immunodominant antigens of adult stages of *Trichinella*. Their role in the intestinal immunity. Laboratoire associé México City, México Pr. G.ORTEGA PIERRES (Centro de Investigacion y Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Genética y Biología Molecular). (Coordonnateur)

**6 - Contrat AFCRST. 1996 "Biotechnology" PRA 96-06.** Cloning and expression of gene coding for immunodominant antigens of L1NN/adult stages of *Trichinella* with procaryotic vectors and attenuated Aujeszky virus. Establishing of a recombinant vaccine against *Trichinella* and Aujeszky disease. Laboratoire associé: Changchun, P.R. China Pr. Liu Mingyuan. Changchun University of Agriculture and Animal Sciences. Trichinellosis Laboratory. (Coordonnateur)

**7 - Contrat CEIS 1997: n° 321.** "Identification de gènes impliqués dans la virulence au stade L1NN de *T. spiralis*. (1997-2000). Laboratoire associé: Changchun, P.R. China Pr. Liu Mingyuan. Changchun University of Agriculture and Animal Sciences. Trichinellosis Laboratory. Responsable scientifique

**8 - Contrat AQS 1999-2002.** 250KF. Détection automatisée des larves de trichine selon la méthode Officielle à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images et de reconnaissance de forme . Associés : LVD Vaucluse, MICROVISION Instrument, Bouvry SA. (Coordonnateur)

**9- Contrat Recherche et Développement avec la SEPPIC 1999-2002.** 180KF. Screening d'adjuvants pour l'immunité mucoale : analyse avec le modèle *Trichinella*. (coordonnateur)

**10 - Contrat bourse doctorale en alternance 2000-2002 ambassade de France en Chine.** bourse doctorale pour M.FU Baoquan, n°BD037. (Coordonnateur)

**11 - Contrat bourse post doctorale 2000 .** M.LIU Mingyuan, n°BPD040. responsable scientifique

**12- Contrat AQS 2000-2003.** 350KF. Développement d'un ELISA précoce chez le porc et le sanglier pour le dépistage de la Trichinellose. Associés : Institut Pourquier, Groupement des éleveurs de viande porcine de l'Ouest.Coordonnateur.

**13 - Programme national de surveillance sérologique des sangliers sauvages 2000-2001.** Sérologie Trichine : Epidémiologie de la trichinellose dans la faune sauvage. Associés ONC, LVD. 30KF. (Coordonnateur)

**14- Programme spécifique de surveillance sérologique des sangliers sauvages 2000-2003.** Mise en place d'un prélèvement alternatif chez le sanglier pour la sérologie trichine. Associés ONC, LVD. 90KF. (Coordonnateur)

**15- Contrat TRICHIPORSE UE.** Safe pork and horse meat on EU-markets : early and unbiased diagnostic tests for *Trichinella*. Key action 1 : Food, Nutrition and Health (Rapid detection test for pathogens, xenobiotics).1.28M Euros, consortium de 10 laboratoires européen (2001-2004). (Coordonnateur)

**16- Contrat ECOS-ANUIS 2001-2005 MA01A02 .** Activation des mastocytes de porcs et de rats par les antigènes de *Trichinella* : conséquences pour l'immunité mucoale intestinale. (Coordonnateur)

**17- Programme national de surveillance sérologique des sangliers sauvages 2001-2002.** Sérologie Trichine : Epidémiologie de la trichinellose dans la faune sauvage. Associés ONC, LVD. 10Keuros (Coordonnateur)

## **INTERVIEWS JOURNALISTIQUES**

**-La semaine vétérinaire n°1027 29 septembre 2001** : La trichinellose porcine . 41-42

**-La semaine vétérinaire n°917. 19 décembre 1998. Marie Christine Favé.** La trichinellose. Une zoonose émergente. 4-6.

**-Le Quotidien du médecin , Dr Catherine Faber** : Trichinellose : des spécialistes demandent des mesures de contrôle plus efficaces. N°6391 2 décembre 1998. 15-16

**-Libération. Catherine Coroller** : La viande de cheval contaminé saute l'obstacle vétérinaire. 8 décembre 1998. p20

**-Le Monde. Jean Yves Nau.** Une épidémie de trichinose démontre les failles du système de la veille sanitaire. 8 décembre 1998. p12

**-BFM Radio 96.4.** 7 décembre 1998.

## **DIVERS**

**-Co-organisation avec J Dupouy-Camet (Hôpital Cochin) de la Tenth International conference on Trichinellosis (ICT10) Fontainebleau France 21-24 August 2000.**

**-Organisation de la réunion d'hiver de la société française de parasitologie Janvier 2002.**

**-Membre Elu au Conseil scientifique de l'ENVA en tant que représentant du personnel scientifique non enseignant (2001-2004)**

# **ANNEXE 1 : MISSIONS ADMINISTRATIVES, EXPERTISES EFFECTUEES**

J'ai été affecté au LCRV en 1984 à l'issue de mon année de spécialisation dans l'Ecole Nationale des Services Vétérinaires. A l'époque le LCRV était un laboratoire sous tutelle directe de la Direction de la Qualité devenue Direction Générale de l'Alimentation. Bien que la position de vétérinaire inspecteur soit « légitime » dans un laboratoire des Services Vétérinaires (comme mon statut de l'époque le démontrait) on m'a proposé une fonction administrative précise et définie, à ma charge d'assurer ma formation scientifique en gérant au mieux cette mission. J'ai donc eu, en premier, la gestion des AMM vétérinaires. Puis un déplacement de cette mission s'est effectué progressivement en 1989-1990 au profit d'une mission biotechnologie/biosécurité (travail avec l'AFNOR, membre de la commission de Génie Biomoléculaire, participation à différents groupes de travail ayant permis l'élaboration du décret de protection du travailleur vis-à-vis du risque biologique, membre de CHS central du CNEVA puis de l'AFSSA). J'assume toujours cette mission étant membre de la Commission de Génie Génétique et du Comité spécialisé Biotechnologie de l'AFSSA.

## **I Commission d'AMM vétérinaire**

La première mission administrative qui m'a été confiée fut de gérer les AMM « sérums et vaccins vétérinaires » et autovaccins. Je l'ai assuré pendant 6 ans. Le travail consistait à présenter sous forme synthétique les avis des contrôleurs pour chaque produit à la commission d'AMM et d'éditer l'avis au pétitionnaire. J'ai réalisé la présentation de 350 dossiers de demande d'AMM et 300 renouvellements. J'ai été contrôleur pour le premier vaccin leucose féline déposé sur le marché puisque je développais à l'époque un sujet d'étude sur la production des différents types du virus FeLV. Quelques années plus tard (1986) le premier vaccin recombinant FeLV était déposé pour un avis européen et la France était choisie comme rapporteur. Avec M Remond nous avons expertisé ce dossier « biotechnologie » et l'avons présenté au comité spécialisé à Bruxelles. Le pétitionnaire a obtenu la première AMM vétérinaire européenne après avoir répondu aux 70 questions posées par les différents pays et explicitées par le rapporteur. Dans la même période j'ai été amené à expertiser la partie Biotechnologie des dossiers Hormones de croissances bovines de différents pétitionnaires. Le premier de ces dossiers « mesurait » 40 000 pages et aucun guide n'existait en la matière pour évaluer ce type de produit en France. L'animation du groupe de travail biotechnologie des laboratoires nationaux m'a permis d'élaborer un premier document de synthèse utile

pour les produits biologiques recombinants. Aucun des dossiers « Hormone de croissance bovine » n'a reçu d'AMM européenne dans le cadre de la directive Biotechnologie en dépit d'un avis favorable du comité vétérinaire spécialisé. En parallèle, j'ai dû animer plusieurs groupes de travail spécifiques (vaccins équin, vaccins injectés dans l'œuf, vaccins porcins...) et ai été membre du groupe 15V de la pharmacopée européenne.

Le contrôle des auto-vaccins consistait à réaliser une visite du lieu de fabrication et de formuler un avis en considérant le protocole de fabrication, les contrôles et les agents pathogènes manipulés. J'ai ainsi pu donner un avis favorable pour un agrément pour 5 lieux de fabrication. Au moins l'un d'entre eux est toujours opérant.

En résumé, ce travail essentiellement administratif m'a initié aux différents produits biologiques, aux contraintes de la fabrication des médicaments vétérinaires et m'a progressivement fait découvrir les premiers produits issus des biotechnologies avec une participation à l'établissement d'une jurisprudence. Les premières normes de contrôle de ces produits ont été publiées dans une revue technique interne aux laboratoires nationaux des services vétérinaires.

➤ Valorisation : T1, T3

## **II Mission de normalisation**

### **A) AFNOR et CEN (Comité Européen de Normalisation)**

A mon arrivée dans le laboratoire de M Rémond (1985), je me suis intéressé à produire et purifier des particules virales du FeLV. J'ai cherché à connaître les conditions de protection du travailleur pour manipuler ce type de particules virales. L'INRS m'a confirmé l'absence de norme en la matière.

L'expérience que j'avais acquise en matière de contrôle des produits biotechnologie et mon intérêt pour la protection du travailleur face aux produits biologiques m'a conduit à la commission de normalisation « Biotechnologie » ; j'ai participé à la rédaction d'un certain nombre de normes dans la série X42. En particulier j'ai été le rédacteur de la norme X42-075 « guide de bonne pratique dans les laboratoires de microbiologie vétérinaires » qui est couramment cité depuis sa publication dans de nombreux textes réglementaires et dans beaucoup de dossiers d'expertise concernant la production de vaccins. La définition des pathogènes de classe Ea1, Ea2 et Ea3 a été proposée avec l'aide de F Moutou et a été reprise dans des textes normatifs ou réglementaires de droit français ou belge.

Les normes de la série X42 ont été reprises au niveau européen selon une nouvelle logique (parfaitement discutable) consistant à faire une norme par thème (classification, confinement, matériel, sécurité..) et secteur (laboratoire/industrie). J'ai animé le groupe de travail pour la norme européenne WG49 consistant à collationner les différentes classifications existantes ou naissantes des pathogènes animaux. Un consensus devait être dégagé. Ce document publié sous le nom de la norme CEN CR 12894/1997 a été repris récemment par le guide de la CGG disponible sur le site Web du ministère de la

recherche (cf CV).

## **B) Expertises et membre de Commissions spécialisées**

### **1) Membre de la Commission de Génie Biomoléculaire (1990-1996)**

J'ai été proposé à la Commission de Génie Biomoléculaire au départ de J Blancou. La CGBM se situe en amont de la Commission d'AMM vétérinaire puisqu'elle a pour fonction d'émettre un avis pour les ministres de tutelle sur les expérimentations non confinées des OGM. Pendant les 2 mandats et demi que j'ai eu dans cette commission, j'ai expertisé plus de 120 dossiers en tant que rapporteur interne (la commission fonctionnait avec 2 rapporteurs internes et un rapporteur externe). L'essentiel de ces dossiers étaient cependant des plantes transgéniques. Cette activité m'a conduit à participer à quelques réunions publiques d'information sur les OGM.

### **2) Membre de la Commission de Génie Génétique (1996-..)**

J'ai été nommé à la Commission de Génie Génétique en 1996 et ai quitté la CGBM. Cette commission se situe encore plus en amont que la précédente puisque sa mission est de classer les OGM et de définir le niveau de confinement du lieu de manipulation. Je m'implique essentiellement dans le classement des OGM en santé animale et l'adéquation du confinement de l'animalerie avec le classement retenu de l'OGM.

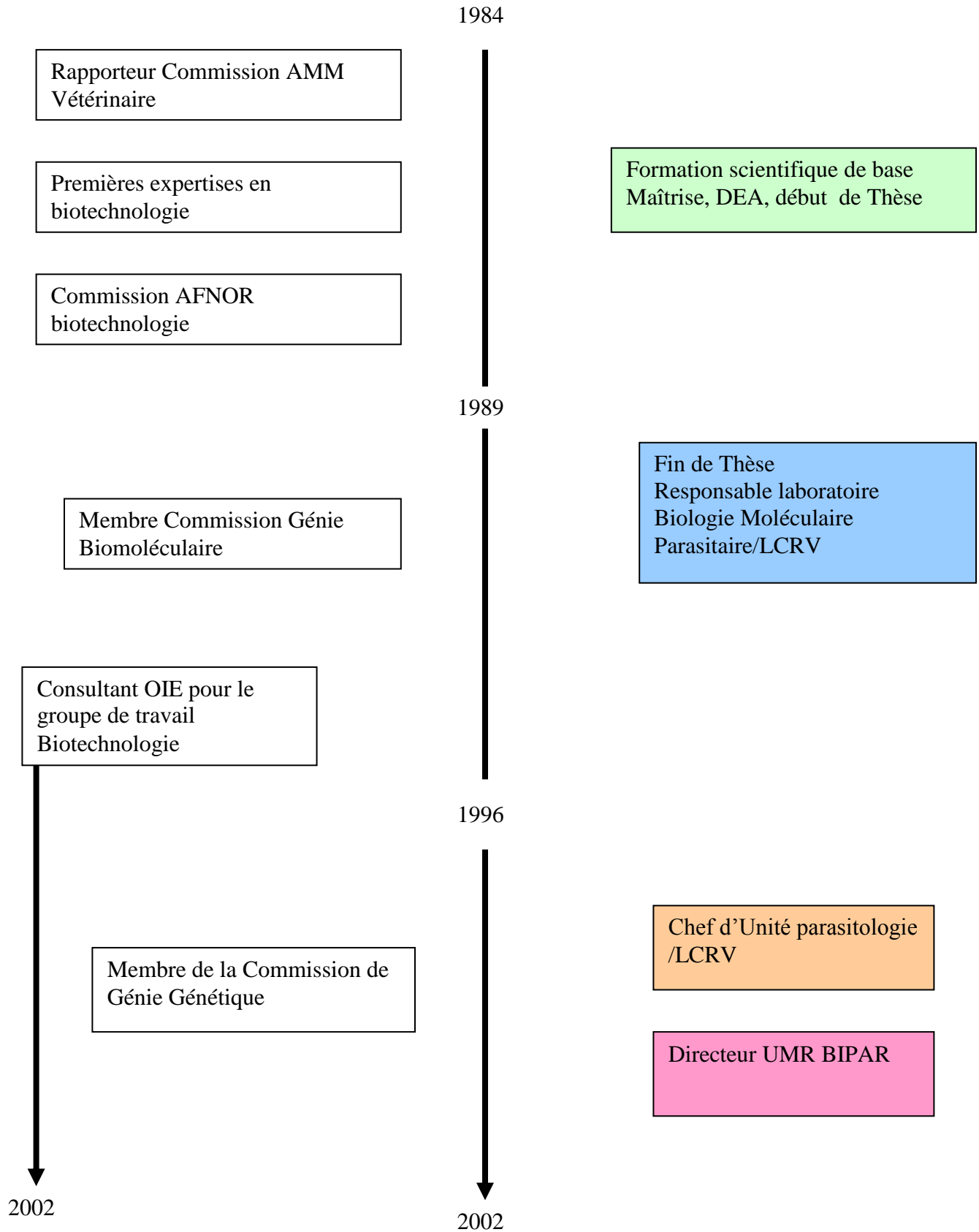
### **3) Consultant à l'OIE en Biotechnologie depuis 1990**

En 1988 un groupe de travail Biotechnologie a été créé à l'OIE. Le Directeur Général de l'OIE m'a demandé en 1990 de réaliser une base de données en biotechnologie vétérinaire. J'ai réalisé les premières synthèses publiées dans une revue spécialisée de l'OIE entre 1992-1996. Puis j'ai proposé la réalisation d'un logiciel de gestion spécifique et sa mise à disposition sur le site web de l'OIE. Cette base de données regroupe les principaux axes de recherche en biotechnologie et les résultats des laboratoires de référence de l'OIE. Une extension aux laboratoires « du monde vétérinaire » a été réalisée mais la réactualisation n'a pas été faite. Cette base de données avec son logiciel spécifique est toujours disponible sur internet ([www.OIE.int/biotechnologie](http://www.OIE.int/biotechnologie))

En résumé, ces missions administratives apparemment diverses ont été réalisées dans les structures nouvelles d'évaluation des OGM ou de leurs dérivés. Une partie du travail a concerné l'édification de règles de protection du travailleur au contact de pathogènes animaux (normes AFNOR, normes CEN, réglementation sur la protection du travailleur, guide de la CGG) qui sont en application. Le second volet s'est concrétisé par la collecte d'informations (travail au CEN et à l'OIE). Un troisième volet a consisté à élaborer une jurisprudence de l'évaluation des produits biologiques de la partie aval (AMM vétérinaires, édification de guides spécifiques, généraux...) vers la partie la plus amont de la manipulation d'un produit biologique (classification des pathogènes animaux (norme CEN) ou des OGM (guide de la CGG)).

➤ Valorisation : T4, T8, O1-O6, S1, normes et ouvrage collectif, conférences techniques

## Evolution des missions administratives en parallèle des principaux acquis scientifiques et responsabilités de laboratoires



## **ANNEXE 2 CONGRES INTERNATIONAL SUR LA TRICHINELLOSE**

Ce document constitue une synthèse publiée en partie dans le Compte Rendu du Congrès (Parasite S8, 2001)

### **Dixième Conférence Internationale sur la Trichinellose Fontainebleau, France, 20-24 Août 2000**

La Dixième conférence internationale sur la Trichinellose s'est déroulée à Fontainebleau les 20-24 Août 2000 sous l'égide de la Commission Internationale de la Trichinellose (Président D Murrell actuel Directeur de l'Institut de parasitologie de Copenhagen). Le congrès a réuni 147 scientifiques de 34 pays. La présence de scientifiques mexicains a été particulièrement marquée grâce à la collaboration ECOS ANUIES développée. Il en est de même des scientifiques chinois qui ont pu rejoindre le congrès grâce aux contrats PRA ou CEIS. Plus de 170 communications ont été proposées et ont été publiées dans le livre des résumés et ont concerné différents aspects de la recherche sur la biologie de la maladie ou les méthodes de lutte. Les communications écrites pour les actes du congrès ont été évaluées comme tout article scientifique avec sa propre commission scientifique (20% de refus et 95% de corrections demandées) et ont été publiées dans un numéro spécial de la revue Parasite en juin 2001. La trichinellose demeure bien une zoonose importante de répartition mondiale directement liée à la consommation de viande.

Lors de la séance introductive concernant l'histoire de la recherche sur *Trichinella*, William C. Campbell (Drew University) a daté les premières photographies des scientifiques travaillant sur *Trichinella* et les premiers dessins du parasite et de son cycle par une série de photographies des événements de l'époque dont la "guerre" du porc entre les USA et l'Allemagne qui imposait la présence d'une cohorte de contrôleurs des viandes. J. Blancou (OIE) a complété cet exposé en insistant sur la difficulté du diagnostic de routine qui a peu évolué depuis un siècle.

Plus de 500 isolats parasitaires ont été référencés au cours des 10 dernières années par le centre international de référence à Rome (E. Pozio). Dix génotypes sont clairement établis et 6 d'entre eux constituent des espèces: aux bien connues *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, se sont rajoutées deux nouvelles espèces *T. murrelli* and *T. papuae*. *T. murrelli* est rencontrée chez les carnivores sauvages des régions tempérées de l'Amérique du nord et est l'homologue de *T. britovi* rencontrée en Europe. *T. papuae* est une nouvelle espèce partageant des caractéristiques communes

avec *T. pseudospiralis* (espèce non encapsulée dans la cellule musculaire). Ces deux espèces non encapsulées pourraient constituer un nouveau genre (Pozio et al.). L'identification des espèces de *Trichinella* se réalise par un test PCR simple ou multiple en utilisant des amorces dérivant des séquences intergéniques ribosomiques ou des gènes d'ARNr (Zarlenga et al.; Van der Giessen et al.).

La trichinellose est une maladie émergente ou ré-émergente chez l'homme dans certains pays comme la Roumanie (plus de 15 000 cas cliniques après consommation de viande de porc au cours des 10 dernières années, Curca et al.), la RP de Chine (environ 25 000 cas décrits au cours des 25 dernières années provenant essentiellement de la consommation de viande de porc, Wang & Cui, Liu & Boireau), l'Argentine (plus de 5200 cas en 10 ans, Bolpe & Boffi). La situation est toujours critique dans les pays ayant subi des conflits ou troubles économiques majeurs au cours des précédentes années. C'est le cas de la Yougoslavie (Cuperlovic et al.), de la Croatie (Marinculic et al.), de la Lituanie (Laiskonis et al.). Cependant la trichinellose demeure un problème sérieux dans les pays maintenant un niveau de contrôle vétérinaire élevé et plusieurs épidémies ont été rapportées en Italie, Allemagne et en France entre 1998 et 2000 (Haeghebaert et al., Tamburrini et al.). Les épidémies principales touchant plusieurs centaines de personnes ont été corrélées à la consommation de viande de cheval; en Allemagne les différents cas cliniques ont été étroitement liés à la consommation de saucisses de porc peu cuites. (Noeckler et al.). Un épisode sérieux a été rapporté en République Slovaque et a été attribué à la consommation de saucisses à base de viande de chien (Dubinski et al.). D'autres données épidémiologiques concernant plus de 20 pays ont également été décrites, la plupart d'entre elles se focalisant sur l'étude de la faune sauvage. Ancelle & Dupouy-Camet ont résumé le système actif de surveillance de la trichinellose humaine existant en France qui a été officialisé récemment.

La biologie de *Trichinella*, nématode intra-cellulaire, demeure un sujet de recherche passionnant pour de nombreuses équipes. Bernadette Connolly a présenté l'expression de gènes liés au développement chez les espèces encapsulées ou non encapsulées. Judith Appleton et al. ont présenté pour la première fois la transformation des L4 en adultes et leur fécondation dans un système de culture cellulaire épithéliale continue (Caco-2); ce modèle est particulièrement prometteur pour des études en immunologie et pour le criblage de molécules anti-parasitaires. Si la genèse de la cellule nourricière semblait jusqu'alors exclusivement sous l'influence de la sécrétion de parakines par le parasite, il apparaît maintenant que les cellules souches influent également sur la morphogenèse du complexe final Trichine-cellule hôte (Takahashi et al.); des activités endonucléasiques mises en évidence dans les produits d'excrétion/sécrétion (ES) pourraient participer à la réorganisation de la cellule musculaire parasitée (Mak & Ko). De nouveaux gènes impliqués dans la biologie du parasite ont été caractérisés : gène d'une thymidilate synthase (Dobrowska et al), des gènes codant pour des protéines fixant l'ADN (Kuratli et al., Garcia-Reyna et al.), identification d'une protéase à sérine (Trap et al.), d'une metallo-protéase (Lun et al.), d'un gène codant pour une protéine fixant le GTP (Rodriguez et al).

Les antigènes parasitaires font toujours l'objet de nombreux rapports ayant comme finalité l'amélioration du diagnostic sérologique ou la description des épitopes immunodominants. P. Boireau a proposé une classification des épitopes spécifiques ou communs à différents stades parasitaires; plusieurs gènes codant pour des protéines

des stades invasifs ont été décrits. Les protéines codées par ces gènes sont de bons candidats pour un futur diagnostic sérologique précoce chez le porc. Un gène codant pour une protéine de la famille des semaphorines a été décrit ; cette glycoprotéine peut jouer un rôle important dans la réponse immunitaire (Romaris et al). Plusieurs études ont insisté sur l'importance de la réponse immunitaire vis à vis des stades précoces du parasite en particulier vis à vis des antigènes du stade L1 nouveau-née (L1NN) ; un gène cloné de ce stade est reconnu par des serums de porcs expérimentalement infectés (Zarlenga et al). Une réponse forte à base d'IgA dirigés contre les L1NN apparaît comme caractéristique de la réponse immune lors de la phase aiguë de la maladie chez l'homme; cette réponse n'est pas observée lors d'infections chroniques (Mendez-Loredo et al.). Un modèle original d'explant de muqueuse intestinale infestée a été analysé; il est possible de différencier une réponse humorale précoce vis à vis des trois stades antigénique de *Trichinella* (Garcia-Reyna et al.). La réponse cellulaire précoce présente chez la souris un profil Th2 mais le rôle des mastocytes reste prépondérant chez le rat (Arizmendi-Puga et al.) avec une sécrétion directe de TNF alpha sous l'influence des antigènes d'ES. Derek Wakelin a présenté les différentes cellules de la muqueuse intestinale impliquées dans la réponse immunitaire ; les cellules de Paneth pourraient participer à l'expulsion du parasite par la sécrétion de peptides antimicrobiens.

Les modèles expérimentaux sont de la plus haute importance pour étudier la pathogénie du parasite ou la sensibilité de différents hôtes. Kapel et al. ont infecté des porcs avec 9 espèces différentes de *Trichinella* ; seules les espèces *T. spiralis*, *T. britovi* et *T. nelsoni* peuvent survivre plus de 40 semaines chez le porc. Contrairement à ce qui a été observé chez les carnivores et les rongeurs, ces espèces ne résistent pas à la congélation. La transmission verticale de *T spiralis* n'a pas été observée chez le porc et le renard mais a été démontrée chez le furet, le cochon d'Inde et la souris (Webster & Kapel). Pour la première fois des autruches ont été expérimentalement infectées avec une espèce strictement inféodée aux mammifères : *T spiralis*. Même si le taux d'infection parasitaire reste faible cette expérimentation montre bien toute la plasticité de ce parasite à s'adapter à des conditions extrêmes.

La prévention de la trichinellose est fondée sur une information du consommateur (cuisson à cœur de la viande ou congélation) et également sur le contrôle vétérinaire permettant le dépistage direct des larves. Des techniques alternatives ont été présentées : sérologie (Sofronic et al., Viveros et al., Patrascu et al., Yuhe Yan et al.), détection de copro-antigènes (Boulos et al;), PCR (Viveros et al.). Le point critique demeure cependant la mise en place d'une assurance qualité pour le contrôle vétérinaire (Gajadhar et al.) et la certification des élevages indemnes de Trichinellose (Gamble et al.).

L'adaptation à des hôtes multiples de *Trichinella*, sa taille quasi microscopique rendant le diagnostic direct éprouvant et délicat, sa répartition font que cette parasitose persiste dans la chaîne alimentaire en dépit d'effort coûteux et continus de contrôle et prévention. La ré-émergence de ce parasite dans de nombreuses parties du globe particulièrement lors de la déstabilisation des systèmes de contrôle stimule la recherche tant en épidémiologie qu'en développement de méthodes alternatives de dépistage. De nombreuses études ont montré la complexité de la biologie de ce parasite et si le cycle domestique peut être maîtrisé dans certaines régions, ou plutôt type d'élevage, le cycle sauvage demeurera le réservoir. Cette rémanence dans le temps et l'espace justifie

pleinement l'activité continue de la Commission Internationale de la Trichinellose qui a fait un bilan de son action des 4 dernières années (adresse : <http://euliste.krenet.it/ict/>). *Trichinella* demeure cependant un modèle unique en parasitologie par son développement intra-cytoplasmique et la multiplicité des réponses immunitaires induites qui continuera à susciter une recherche conjointe de médecins, vétérinaires et scientifiques pour maîtriser la sécurité sanitaire de la viande.

### **Co-organisateurs**

Pascal Boireau UMR BIPAR, INRA AFSSA ENVA, 22 rue P. Curie, 94703 Maisons-Alfort, France

Jean Dupouy-Camet R. Descartes University, EA 2499/INSERM U529, Hôpital Cochin, 27 Fbrg St Jacques, 75014, Paris

➤ Valorisation E1, X7

# **ANNEXE 03: ACTIVITE DE LABORATOIRE DE REFERENCE**

Devenant Chef d'unité Parasitologie du CNEVA en juillet 1998, je prenais en charge la gestion du laboratoire national de référence trichine. En octobre de la même année une seconde épidémie grave de trichinellose survenait avec un certain nombre de conséquences pour le développement du laboratoire. A côté de cette activité j'assure la coordination du laboratoire de diagnostic des babésioses équine et de la douve équine. Ces deux dernières activités pilotées par C Perret (AI) permettent d'effectuer chaque année 2500 à 3000 analyses qui génèrent des recettes importantes pour le laboratoire. Ces analyses sont particulièrement importantes pour les exportations et épreuves hippiques de niveau international puisque l'unité est le seul laboratoire français à réaliser la technique de référence pour les échanges internationaux.

## **A L'épidémie de Trichinellose d'octobre 1998**

### **1°) Synthèse**

En décembre 1998, 407 cas de trichinellose humaine étaient recensés dans le sud de la France (Toulouse et Castre). Des formes cliniques sérieuses ont été diagnostiquées (incapacité à se tenir assis, hyperthermie de 40,5°C, myalgie accompagnées d'insomnie, oedème palpébral, état comateux ..). Le cheval incriminé avait été abattu le 9/09/1998. En tant que Laboratoire de Référence des trichinelloses animales nous avons reçu divers prélèvements de viande de cheval venant de familles de malades. Nous avons obtenu une charge parasitaire d'au moins 27L1M/g; l'espèce *T spiralis* était en cause. Nous avons obtenu la souche à partir de deux animaux sentinelles. L'infestation des chevaux remontait à plusieurs mois compte tenu de l'épaisseur de la capsule de la cellule nourricière.

*Mesure de sauvegarde :*

Nous avons assuré pendant une période transitoire de plusieurs semaines le contrôle individuel de tous les chevaux venant de Serbie. Les chevaux testés se sont révélés négatifs.

### **2°) Propositions dans le contexte de la crise**

Trois séries de propositions ont été faites à la tutelle (DGAL)

*Contrôle de la viande chevaline:*

Maintenir l'effectif des laboratoires assurant le contrôle (nécessité de réaliser le contrôle de viande de sanglier en parallèle).

Besoin de garantie totale de la filière chevaline.

- Test sur tous les chevaux en double nécessaire pour augmenter la sensibilité
- Améliorer le test existant par un contrôle qualité à court terme.
- Valider une méthode indirecte colorée de substitution à moyen terme (PCR, hybridation sur filtre).

*Contrôle de la viande de sanglier:*

Un contrôle qualité de la viande de sanglier s'impose également avec un suivi de l'évolution de la maladie par des enquêtes épidémiologiques dans la faune sauvage en France.

*Formation des techniciens indispensable au niveau du laboratoire de référence.*

## **B Activités du laboratoire de référence pendant les années 1999, 2000 et 2001.**

### **1°) La formation**

La formation des techniciens, de responsables de laboratoire et de certains vétérinaires inspecteurs a été assurée depuis l'épidémie de 1998.

Cette formation est toujours assurée au cours de 3 sessions annuelles de 2 jours. Plus de 100 techniciens/responsables de laboratoire ont été formés à ce jour.

### **2°) La confirmation des deux premiers chevaux bloqués pour trichinellose en France**

Deux chevaux ont été bloqués par le personnel formé et ont permis d'affiner la technique de contrôle rétrospectivement. Le premier cheval saisi pour trichinellose en 1999 a été entièrement disséqué ce qui nous a permis de dresser la liste des muscles les plus infestés. Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'apex de la langue est bien un site de prédilection (jusqu'alors seul la langue était préconisée comme site de prélèvement sans autre précision). Les masseters n'ont pas été confirmés comme un site d'élection alors qu'ils étaient pris en compte par la réglementation. J'ai proposé à la DGAL le prélèvement de 50g des piliers du diaphragme en plus de l'apex de la langue pour assurer la traçabilité tête carcasse (la tête est très rapidement séparée sur la chaîne d'abattage entraînant parfois des erreurs d'identification de la carcasse).

### **3°) La mise en place d'un contrôle systématique chez le porc plein air.**

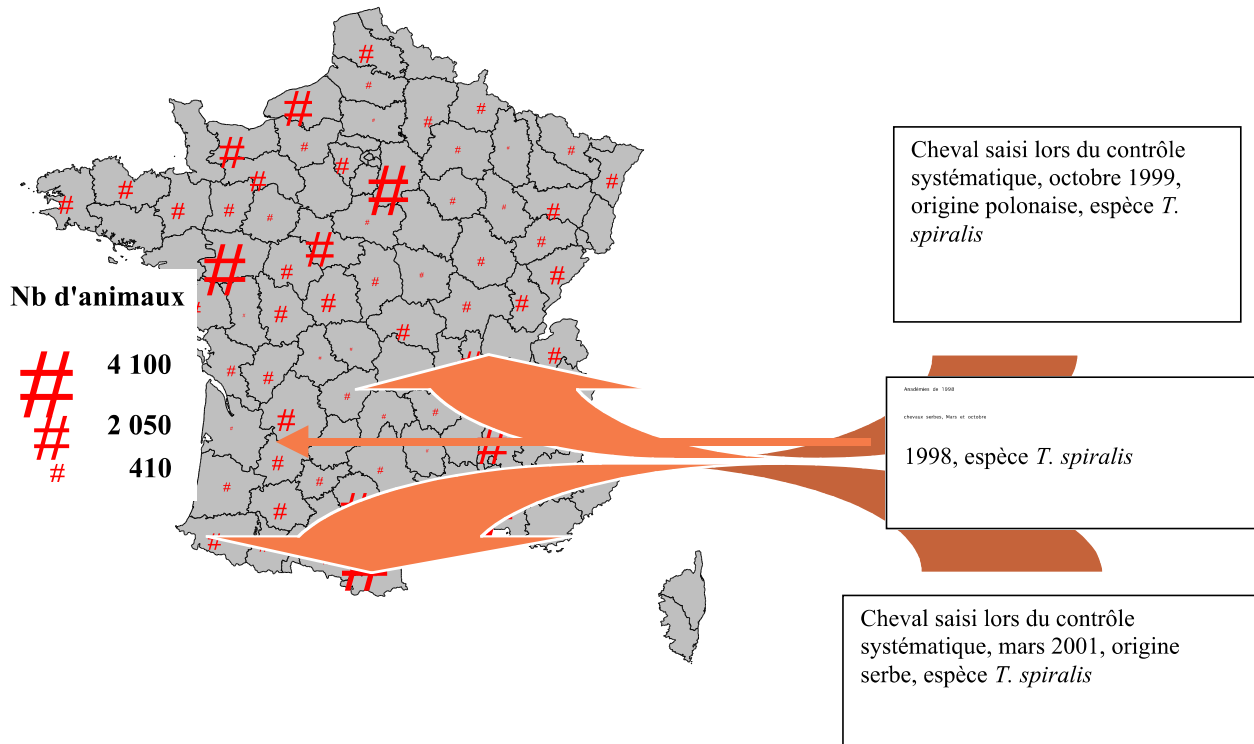
Le porc plein air (porc « label » et porc biologique) a un contact avec la faune sauvage pendant une partie de sa vie.. L'effectif est estimé à 200 000 têtes en France en 2001 avec une croissance de 10% par an au moins. Compte tenu du risque j'ai proposé à la DGAL de mettre en place un contrôle systématique tout en essayant de développer de nouvelles méthodes de contrôle moins coûteuse que le test de dépistage direct (cf contrat TRICHIPORSE).

#### **4°) Une première enquête Trichinellose du sanglier.**

Pour la première fois au niveau européen, une enquête importante (>1000 échantillons) a été réalisée pour le dépistage de la Trichinellose chez le sanglier. Cette enquête complète le travail de diagnostic systématique qui demeure limité par rapport au nombre d'animaux abattus (0,1%). La trichinoscopie est un test officiel utilisée dans certains départements. Ce test est 10 fois moins sensible que le test de digestion artificielle et ne permet pas d'identifier l'espèce *T pseudospiralis* qui a été en 1998 à l'origine de plusieurs cas cliniques suite à la consommation de viande de sanglier en Camargue. Les tests sérologiques étant 10 à 100 fois plus sensibles que les tests directs permettent sont utiles pour délimiter des zones à risques sur le plan épidémiologique.

Des résultats de cette analyse il apparaît que les tests sérologiques sont particulièrement délicats à utiliser chez le sanglier alors qu'ils ont été validés chez le porc d'élevage. Il est nécessaire de développer un ELISA spécifique pour le sanglier. Seul le test TS card qui avait été envisagé à l'origine de cette étude compte tenu de sa robustesse (lyse et contaminants bactériens tolérés) s'est révélé suffisamment discriminant (+ ou -). Les autres tests sérologiques n'ont pas pu être utilisés en l'état et nécessitent une adaptation. Le test d'immunoempreinte est trop sensible, il en est de même du test ELISA (E/S). Le test d'agglutination au latex n'est en revanche pas suffisamment sensible alors que les résultats sont satisfaisants avec des sérums humains. Le résultat de la Corse du Sud est particulièrement intéressant puisque au regard du nombre élevé de sérum transmis la seroprévalence demeure négligeable conformément au statut sanitaire connu dans les Iles de Méditerranée. L'Ile et Vilaine, la Meurthe et Moselle sont des départements ayant parfaitement bien répondu à l'enquête. Ils présentent une seroprévalence plus importante que les autres départements avec le TS card. Ce résultat est à corréliser avec la seule saisie autochtone obtenue en 5 ans. L'enquête sérologique 2002 doit permettre de confirmer ces résultats.

➤ Valorisation: P17, p15, T11, X2, T10, T9, T7, C41, C39, C34, C31, C27, C12,



**Localisation des lieux d'abattage et de contrôle systématique de la viande de cheval en France.**  
 La flèche centrale indique la localisation des anadèmes récentes (1998) et les flèches courbées les abattoirs où ont été saisis pour trichinellose les chevaux infestés. La taille des ronds est proportionnelle au nombre annuel de chevaux contrôlés par la méthode de digestion artificielle.

## **ANNEXE 04**

# **DOCUMENTS D'ÉVALUATION COLLECTIVE , LETTRES DE SOUTIEN**

- 1 Avis du Président de la Commission INSERM spécialisée sur la demande d'un CRI.**
- 2 Avis de la commission de labellisation de l'UMR BIPAR**
- 3 Evaluation du projet TRICHIPORSE accepté en mars 2001**
- 4 Lettres de soutien, évaluations diverses**