



Virus de la Fièvre aphteuse : interactions virus/hôte(s), physiopathologie et mécanismes de persistance

Sandra Blaise-Boisseau

► To cite this version:

Sandra Blaise-Boisseau. Virus de la Fièvre aphteuse : interactions virus/hôte(s), physiopathologie et mécanismes de persistance. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. tel-04426319v1

HAL Id: tel-04426319

<https://anses.hal.science/tel-04426319v1>

Submitted on 30 Jan 2024 (v1), last revised 4 Mar 2024 (v2)

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.



Habilitation à Diriger des Recherches

Virus de la Fièvre aphteuse : interactions virus/hôte(s), physiopathologie et mécanismes de persistance

Ecole Doctorale : ED 581 ABIES

Candidate : Dr Sandra Blaise-Boisseau

Soutenance le **17 janvier 2024** devant le jury composé de :

- Pr Pierre-Emmanuel CECCALDI, rapporteur
- Pr Sandie MUNIER, rapporteure
- Pr Géraldine SCHLECHT-LOUF, rapporteure
- Dr Stéphane BIACCHESI, examinateur
- Dr Sandra MARTIN-LATIL, examinatrice
- Pr Jean-François VALARCHER, examinateur
- Dr Labib BAKKALI KASSIMI, examinateur
- Dr Stéphan ZIENTARA, examinateur

Anses

Laboratoire de Santé Animale
UMR Virologie Anses Inrae Enva
14 rue Pierre et Marie Curie
94700 Maisons-Alfort cedex
Tel : 01 49 77 28 24

Table des matières :

REMERCIEMENTS	5
ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	9
CURRICULUM VITAE DETAILLE	12
Cursus universitaire	12
Fonction actuelle	13
Expérience post-doctorale	13
Expérience doctorale	14
Responsabilité de recherche	14
Activités de formation par la recherche	20
Autres activités	25
Formations	27
Valorisation	27
PARTIE I : SYNTHÈSE DE MES TRAVAUX DE RECHERCHE	42
TRAVAUX DOCTORAUX ET POST-DOCTORAUX	42
1. Analyse <i>in vivo</i> du potentiel immunosuppresseur de protéines d'enveloppe rétrovirales	42
2. Caractérisation fonctionnelle d'une protéine d'enveloppe endogène rétrovirale de la famille HERV-FRD, conservation au cours de l'évolution et signification biologique potentielle	44
3. Etude des mécanismes impliqués dans le contrôle du VIH-1 dans des cellules trophoblastiques humaines naturellement résistantes à l'infection	48
TRAVAUX RÉALISÉS À L'ANSES/LSAI/VAE	50
1. Utilisation du bactériophage MS2 comme contrôle universel des diagnostics de détection des virus entériques à partir de prélèvements (eaux, aliments)	51
2. Impact de procédés utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sur la survie virale dans des matrices alimentaires végétales de type fruits rouges	54
3. Détection du virus de l'hépatite E (VHE) dans les aliments et l'eau par RT-PCR en temps réel	55
TRAVAUX RÉALISÉS À L'ANSES/LSAn/UMR VIROLOGIE/BIOPIC	56
1. Contexte et thématique de mes travaux de recherche : La fièvre aphteuse, une maladie animale virale ancienne toujours d'actualité	57
1.1 La fièvre aphteuse : historique de la maladie	58
1.2 Le virus de la fièvre aphteuse	58
1.3 Spectre d'hôtes et modes de transmission	59
1.4 Signes cliniques et progression de l'infection	60
1.5 Persistance virale chez les ruminants	61
1.6 Vaccination anti Fièvre aphteuse	61

1.7 Distribution spatio-temporelle et épidémiologie moléculaire	62
1.8 Diagnostic	63
2. Développement / Amélioration d'outils diagnostic	65
2.1 Développement d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse	65
2.2 Développement d'un test unique multiplex pour la détection et le typage moléculaire du virus de la Fièvre Aphteuse, en multiplex	66
2.3 Développement et validation de deux méthodes de rtRT-PCR pour la détection du virus de la fièvre aphteuse en une seule étape, en duplex ou triplex	68
2.4 Développement et Evaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le sérotypage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest	68
2.5 Développement d'une plateforme mobile de séquençage	69
2.6 Du terrain au laboratoire : Promouvoir la soumission d'échantillons suspects de fièvre aphteuse aux laboratoires de référence	70
3. Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse	72
3.1 Premier isolement viral et caractérisation moléculaire du virus de la fièvre aphteuse au Bénin	72
3.2 Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse au Tchad	72
3.3 Reconstruction phylodynamique de l'histoire du topotype O/EA-3 du virus de la fièvre aphteuse en Afrique	72
4. Stratégies vaccinales anti fièvre aphteuse	73
4.1 Virus recombinant chimère EMCV-FMDV pouvant être utilisé comme vaccin vivant, atténué et marqueur contre la fièvre aphteuse	73
4.2 Signatures transcriptomiques et prédiction de l'efficacité de la réponse vaccinale	73
4.3 Projet SPIDAC : Nouveaux vaccins contre la fièvre aphteuse et tests diagnostiques Compagnons	73
5. Interactions FMDV/hôte et mécanismes de persistance du FMDV	73
5.1 Déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse	74
5.2 Modèle d'infection persistante de cellules épithéliales primaires de nasopharynx bovin par le virus de la fièvre aphteuse et analyse transcriptionnelle de la réponse de l'hôte	75
5.3 Cartographie d'interactions entre les protéines du FMDV et les protéines bovines par crible double hybride en levure	78
5.4 Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféactomique » chez 4 espèces cibles (<i>Bos taurus</i> , <i>Ovis aries</i> , <i>Capra Hircus</i> et <i>Sus scrofa</i>)	80
5.5 Persistance du virus de la fièvre aphteuse: des signatures protéogénomiques de la réponse de l'hôte aux marqueurs diagnostiques candidats et au contrôle thérapeutique	85
CONCLUSION	88

PARTIE II : PROGRAMME DE RECHERCHE	90
1. Interactions FMDV/hôte et mécanismes de persistance du FMDV	90
1.1 Validation d'interactions en contexte infectieux	90
1.2 Cartographie des domaines d'interaction de la 3Dpol avec les protéines cellulaires de la voie IFN I	90
1.3 Persistance et autophagie	90
1.4 Interactions protéines-protéines FMDV/Buffle africain	90
1.5 Modulation thérapeutique de la persistance	91
1.6 Modèles 3D in vitro pour étudier la physiopathologie du virus FA et les mécanismes de persistance	92
2 Diagnostic et surveillance de la fièvre aphteuse, du terrain au laboratoire	92
2.1 Evaluation du protocole LFD-INACT sur d'autres tests d'immunodétection	92
2.2 Optimisation des transfections d'ARN pour le « virus rescue »	93
2.3 Immortalisation de cellules DSP porcines à visée diagnostic	53
2.4 Marqueurs de persistance virale	93
3 Nouveaux vaccins contre la fièvre aphteuse et tests diagnostiques compagnons	93
3.1 Vaccins chimériques FMDV/BRBV	93
3.2 Tests diagnostiques compagnons	93
CONCLUSION	94
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
WEBOGRAPHIE	96

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement l'ensemble des membres de mon jury d'Habilitation à Diriger des Recherches pour leur temps consacré à évaluer ce travail.

Merci au **Pr Pierre-Emmanuel CECCALDI** et aux **Pr (e) Sandie MUNIER** et **Géraldine SCHLECHT-LOUF**. Merci à vous trois d'avoir accepté de faire partie de mon jury d'HDR en tant que rapporteur(e)s.

Merci au **Dr (e) Sandra MARTIN-LATIL**, au **Dr Stephane BIACCHESI**, au **Pr Jean-François VALARCHER** ainsi qu'au **Dr labib BAKKALI KASSIMI** et au **Dr Stéphan ZIENTARA** d'avoir accepté la mission d'examinatrice et examinateurs.

Merci à **Labib BAKKALI KASSIMI**, **Stéphan ZIENTARA** et au **Dr Pascal Boireau** qui m'ont accueillie dans l'UMR en juin 2009 et qui m'ont permis de rejoindre une unité et une thématique enthousiasmante et stimulante ; merci pour votre confiance et votre soutien indéfectible.

Merci au **Dr Alexandre PERY** pour sa confiance et son aide précieuse pour la partie administrative du processus d'inscription à l'HDR. Merci à Latifa Zeroual pour son aide précieuse également.

Merci au **Pr Françoise Barré-Sinoussi** et mon équipe de post-doc « TME », Elisabeth, Claude, Ahidjo et Marie-Thérèse. Mon post-doc fut court mais riche d'enseignements.

Merci à tous les membres de l'UMR Virologie et aux membres de mon équipe BIOPIC, passés et présents, pour tout ce que nous partageons et les liens scientifiques et humains que nous créons et cultivons. Merci pour votre présence, votre soutien, votre travail, votre confiance. Mention spéciale à Damien, Aurore (s), Manu (le philosophe), Cécile, Corinne, Eve, Hélène, Greg, Gaëlle, Guillaume Sophie, Lydie, Bahia, Dominique, Lauren et Sandra (SML). Merci infiniment. Merci également aux membres du LSA_n et LSA_l pour nos liens et votre soutien. Merci les Gregory K et J, Maud, Benoît et Gina.

Merci à tous mes stagiaires, étudiants et doctorants, avec une mention spéciale pour mon cher Padawan Morgan qui a quitté le labo fin septembre pour de nouvelles aventures post-doctorales, après 3 magnifiques années. Tous mes vœux Morgan au pays des kangourous et au-delà !!

Merci à tous mes collaborateurs et partenaires pour le plaisir de travailler ensemble sur de nombreux projets et pour les défis à relever toujours dans un bel esprit. Merci notamment à JF, Sarah, Michael, David, Damien et Greg.

Merci à mes amis et notamment mes co-danseuses avec qui je partage cette passion qui est un véritable exutoire et pour le plaisir à se retrouver pour fouler la scène du Ludion de Villemoisson village.

Merci à mon mari Ludovic qui me soutient depuis plus de 20 ans et pour sa compréhension quand le travail de chercheuse déborde sur la vie privée et familiale... (et c'est assez souvent...)

Merci à mes enfants Maxence et Camille, mes précieux, le sacré du sacré (et parfois de sacrés phénomènes adolescents encore inexpliqués par la science). Vous voir grandir et vous épanouir est un bonheur quotidien.

Merci à mes neveux Damien et Angéline, toujours présents

Merci à ma famille de cœur, Richard, Hélène et William avec une pensée pour Mamy Suzanne

Merci à ma maman, pour son courage et pour m'avoir toujours laissée libre de mes choix

A ma sœur...

ABREVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire
ANR : Agence Nationale de la Recherche
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
ANRS : Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales
ARN : Acide Ribonucléique
AST : Appui Scientifique et Technique
BEI : Binary Ethylenimine (Ethylenimine Binaire)
BHK-21 : Baby Hamster Kidney
BIOPIC : Biologie des Picornavirus
BIOR : Biologie des ORbivirus
BUcEC : Bovine umbilical cord endothelial cells
CEN : Comité Européen de Normalisation
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CT : Cytotrophoblaste
Ct : Cycle Threshold
DEA : Diplôme d'Etudes Approfondies
DIVA : Differentiating infected from vaccinated animals
DSP : Dorsal Soft Palate
EBV : Epstein-Barr virus
ECP : Effet Cytopathique
ED : Ecole Doctorale
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMCV : EncephaloMyoCarditis Virus
EUFMD : European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease
FA : Fièvre Aphteuse
FAO : Food and Agriculture Organisation
FAR : Fund for Applied Research
FelV : Feline Leukemia Virus
FCO : Fièvre Catarrhale Ovine
FLI : Friedrich Loeffler Institut
FMDV : Foot and Mouth Disease Virus
GFRA : Global Foot-and-Mouth Research Alliance
GST : Glutathion S-transférase
HAV : Hepatitis A virus
HEK293T : Human Embryonic Kidney
HERV : Human Endogenous RetroVirus
HEV : Hepatitis E Virus
HIV : Human Immunodeficiency Virus
IAL : Interface Air Liquide
IBRS-2 : Instituto Biologico-Rim Suino-2
ICRAD : International Coordination of Research on infectious Animal Diseases

IRES : Internal ribosome entry site
IFN : Interféron
IPA : Ingenuity Pathway Analysis
IPP : Interaction protéine-protéine
IRES : Internal Ribosome Entry Site
ISG : Interferon Stimulated Gene
Kb : Kilobases
LFD : Lateral Flow Device
LNERV : Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires
LNR : Laboratoire National de Référence
Lpro : Leader protein
LRUE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
LTR : Long Terminal Repeat
MAVS : Mitochondrial Antiviral Signalling protein
MDBK : Madin-Darby Bovine Kidney
MoMLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MOI: Multiplicity Of Infection
MPMV : Mason-Pfizer Monkey Virus
MVA : Modified vaccinia virus Ankara
MVP: Maladie Vésiculeuse du Porc
Nmi : N-myc and STAT interacting
NGS : Next Generation Sequencing
NoV : Norovirus
NSB3 : Niveau de Sécurité Biologique 3
Nt : Nucleotides
OIE : Office International des Epizooties
OMSA : Organisation Mondiale de la Santé Animale
ORF : Open reading Frame
PEG : Polyéthylène Glycol
PK15 : Porcine Kidney-15
rtRT-PCR : real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAT : Southern African Territories
SLU : Swedish University of Agricultural Sciences (Université Suédoise des sciences agricoles)
ST : Syncytiotrophoblaste
SU : (sous-unité de) Surface
SVDV : Swine vesicular disease virus
SVV : Seneca Valley Virus
TBEV : Virus de l'Encéphalite à Tiques (Tick Borne Encephalitis Virus)
TCID50 : 50% tissue culture infective dose
TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective
TM : (sous-unité) TransMembranaire
UMR : Unité Mixte de Recherche

VHA : Virus de l'Hépatite A

VHE : Virus de l'hépatite E

VP : Viral protein

VPg : Viral Genome Linked Protein

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure schématique des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales	43
Figure 2. Séquence du domaine immunosuppresseur de différents rétrovirus	43
Figure 3. Structure et organisation génétique des formes génomique et provirale des rétrovirus	44
Figure 4. Endogénisation des rétrovirus et formation des rétrovirus endogènes humains (HERV).	45
Figure 5. Conservation fonctionnelle de la protéine d'enveloppe HERV-FRD	46
Figure 6. Détail d'une villosité chorale, unité structurale et fonctionnelle du placenta humain	47
Figure 7. L'expression de la glycoprotéine fusogène HERV-FRD Env (syncytine-2) dans le placenta humain est limitée aux cellules cytotrophoblastiques villositaires.	47
Figure 8. Mécanismes de transmission verticale du VIH	48
Figure 9. Transmission du VIH-1 de la mère au nourrisson in utero	49
Figure 10. La syncytine-1 induit la propagation du VIH-1 et établit des réservoirs de VIH dans le placenta.	50
Figure 11. Transmission des virus entériques par l'eau et les aliments	51
Figure 12. Taux moyens de récupération du VHA pour les différents niveaux d'ensemencement (avec ou sans ajout de MS2) et chaque matrice alimentaire	53
Figure 13. Organigramme de l'analyse de l'eau embouteillée selon les procédures 1 à 3	54
Figure 14. Validation du modèle d'inactivation du VHA dans des purées de fruits rouges	55
Figure 15. Première description écrite de la fièvre aphteuse	58
Figure 16. Capside du virus de la fièvre aphteuse entourant le génome d'ARN nu	59
Figure 17. Structure du génome du virus de la fièvre aphteuse et expression des protéines virales	59
Figure 18. Signes cliniques et lésions	61
Figure 19. Situation mondiale de la fièvre aphteuse	63
Figure 20. Analyses de laboratoire à mettre en place en priorité, en fonction du contexte épidémiologique et sanitaire	64
Figure 21. Principe de l'immunoessai pour le diagnostic sérologique de la FA	65

Figure 22. Développement et évaluation d'un test immunologique multiplex basé sur la technologie Luminex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse	66
Figure 23. Méthode de l'amplicon doublement marqué pour hybridation ultérieure sur billes magnétiques luminex	67
Figure 24. Développement et évaluation d'un test multiplex basé sur la technologie Luminex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse (détection et typage moléculaire)	68
Figure 25. Développement et évaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le typage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest	69
Figure 26. Évaluation sur le terrain d'un protocole sûr et peu coûteux, basé sur l'inactivation virale sur test rapide LFD, pour l'envoi d'échantillons suspects de fièvre aphteuse aux laboratoires de diagnostic	71
Figure 27. Persistance du virus de la FA et enjeux associés	74
Figure 28. Un premier modèle d'infection persistante par un FMDV de type O en cellules épithéliales bovines MDBK	75
Figure 29. Modèle d'infection persistante par le virus de la FA dans des cellules épithéliales bovines primaires dérivées de palais mou dorsal, cultivées en multicouches à l'interface air-liquide	76
Figure 30. Analyses transcriptomiques des cellules DSP cultivées en multicouches après infection par le virus de la FA (infection aiguë 24hpi vs infection persistante 28dpi)	77
Figure 31. Gènes différenciellement exprimés uniquement pendant la phase persistante de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse dans le modèle DSP-IAL	78
Figure 32. Crible double hybride en levure pour identifier des interactions protéine-protéine entre le virus de la FA et cellules bovines	79
Figure 33. Projets 2020-2024 dans la suite du projet Transcriptovac (2015-2019)	80
Figure 34. Réponses immunitaires antivirales innées et antagonismes viraux décrits pour le virus de la fièvre aphteuse	81
Figure 35. Identification d'interactions protéine-protéine (IPP) entre les protéines de la voie IFN de type I et les protéines virales du FMDV de type O par criblage bioluminescent NanoLuc-2-Hybrid	82
Figure 36. Identification de sept interactions entre des protéines de la voie IFN-I et la polymérase 3D du FMDV de type O, par crible Nanoluciférase	82
Figure 37. Inhibition de la phase d'induction de la voie IFN de type I par la polymérase 3D du FMDV	83
Figure 38. Isolement de cellules de palais mou porcin et caractérisation	84
Figure 39. Sensibilité des cellules DSP porcines au FMDV	84

Figure 40. Test de l'effet du Ruxolitinib sur la persistance du FMDV dans le modèle DSP bovines IAL, schéma expérimental et plan d'analyse des échantillons	85
Figure 41. Modulation du virus FMDV par le Ruxolitinib dans un modèle d'infection persistante de cellules DSP bovines cultivées à l'interface air-liquide (IAL)	86
Figure 42. Projet FMDV_PerslstOmics (2021-2024)	87
Figure 43. Le virus O de la fièvre aphteuse délété de la protéine Leader ne peut pas établir une infection prolongée ou persistante dans les cellules DSP bovines cultivées à l'interface air-liquide (IAL)	88

CURRICULUM VITAE DETAILLE

Etat civil

Blaise-Boisseau Sandra, PhD

Née le 13 septembre 1977 à Fontainebleau (77)

Mariée, 2 enfants

Adresse postale : 1 rue du clos des merisiers, 91360 Villemoisson sur Orge

Tel portable : 06 60 52 15 30

Tel professionnel : 01 43 96 71 26

E-mail professionnel: sandra.blaise-boisseau@anses.fr

Identifiant ORCID : 0000-0002-8812-2023

CURSUS UNIVERSITAIRE

2010 - 2011 **DIPLÔME UNIVERSITAIRE de Virologie Fondamentale** (*Mention très bien*)
Université Paris 7 Denis Diderot et Institut Pasteur de Paris

2000 - 2004 **DOCTORAT en Sciences** (*Mention très honorable avec les félicitations du jury*)
Université Paris XI

Ecole doctorale ED 418, Cancérologie, Biologie, médecine, santé (CBMS, à présent ED582)

Titre de la thèse : « Caractérisation fonctionnelle d'une protéine d'enveloppe endogène rétrovirale de la famille HERV-FRD, conservation au cours de l'évolution et signification biologique potentielle »

Thèse réalisée dans l'UMR CNRS 8122 « Rétrovirus endogènes et éléments rétroïdes des eucaryotes supérieurs » sous la direction du Dr Thierry Heidmann, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Collaborations : avec l'Unité INSERM U427 dirigée par le Dr Danièle Evain-Brion (Faculté de Pharmacie, Paris) et avec l'Unité INSERM U412 dirigée par le Dr François-Loïc Cosset (Ecole Normale Supérieure, Lyon)

1999 - 2000 **DEA « Bases Fondamentales de l'Oncogénèse »** (*Mention assez bien, 4^{ième}/15*)
Université Paris VII- Denis Diderot

Titre du DEA : « Analyse *in vivo* du potentiel immunosupresseur de protéines d'enveloppe rétrovirales »

Stage de DEA réalisé dans l'UMR CNRS 8122 « Rétrovirus endogènes et éléments rétroïdes des eucaryotes supérieurs » sous la direction du Dr Thierry Heidmann, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

1997- 2000 **Diplôme du Magistère de génétique de l'Université Paris VII- Denis Diderot**
(mention assez bien)

FONCTION ACTUELLE

2009 - 2022 **Chargée de recherche de classe normale** (CR CN depuis le 1^{er} septembre 2017, précédemment CR1 promue le 21 juillet 2011)

ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Maisons-Alfort, France
Laboratoire de Santé Animale (LSAn), UMR Virologie Anses/Inrae/ENVA (Dr S. Zientara), équipe BioPic /LRUE/LNR fièvre aphteuse (Dr Labib Bakkali Kassimi)
LR OMSA et FAO de référence

Thématiques de recherche

- **Mécanismes de persistance du virus de la fièvre aphteuse**
 - ⇒ Développement de modèle d'infection persistante *in vitro*
 - ⇒ Modulation de l'infection persistante
- **Etude des interactions protéine-protéine (IPP) « FMDV – Hôtes »**
- **Développement / optimisation des méthodes de diagnostic du FMDV**
- **Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse**

POSTE PRECEDEMMENT OCCUPE (CONCOURS CR2)

2005 - 2009 **Chargée de recherche 2nde classe** (CR2 nommée le 01/09/2005 suite au concours)

AFSSA - Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Maisons-Alfort, France
Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et les Procédés Agroalimentaires (LERQAP), Unité Virologie des aliments et de l'eau (VAE), sous la responsabilité du Dr Sylvie Perelle, cheffe d'unité.

Thématique de recherche :

- **Virologie alimentaire**
 - ⇒ Développement /amélioration des méthodes de détection des virus (norovirus, virus de l'hépatite A et E) dans l'eau et les aliments
 - ⇒ Impact de procédés utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sur la survie virale dans des matrices alimentaires végétales de type fruits rouges

EXPERIENCE POST-DOCTORALE

2005

Chercheure contractuelle

Contrat post-doctoral financé par l'Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA (ANRS)

INSTITUT PASTEUR, Paris, France

Unité de Régulations des Infections Rétrovirales, (Dr Elisabeth Menu & Pr. F. Barré-Sinoussi)

Thématique de recherche

- **Contrôle de la Transmission Mère-Enfant (TME) du VIH-1 *in utero***
 - ⇒ Etude des mécanismes impliqués dans le contrôle du VIH-1 dans des cellules trophoblastiques humaines naturellement résistantes à l'infection

EXPERIENCE DOCTORALE

2000 - 2004 Doctorante

Allocataire de recherche MENRT, 4^{ème} année de thèse financée par la Ligue contre le cancer

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, Villejuif, France

UMR CNRS 8122 « Rétrovirus endogènes et éléments rétroïdes des eucaryotes supérieurs » (Dr Thierry Heidmann)

Thématique de recherche

▪ **Fonctionnalités des protéines d'enveloppe rétrovirales endogènes humaines**

- ⇒ Etude des fonctions rétrovirales de 16 protéines d'enveloppe de rétrovirus endogènes humains (HERV)
- ⇒ Caractérisation fonctionnelle d'une protéine d'enveloppe endogène rétrovirale de la famille HERV-FRD, conservation au cours de l'évolution et signification biologique potentielle »

RESPONSABILITE DE RECHERCHE

2022 - 2025 Participation au projet (Task leader WP3) **HORIZON-CL6-2021-FARM2FORK-01-06** intitulé « *Improved control of priority animal diseases: Novel vaccines and companion diagnostic tests for African horse sickness, peste des petits ruminants and foot-and-mouth disease* » Acronyme : **SPIDVAC**

- ⇒ Convention 220100, durée du projet : 42 mois, démarrage : 1^{er} Juillet 2022
- ⇒ Coordination : Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Allemagne
- ⇒ Co-coordination : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Collaboration : 13 partenaires : Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Allemagne; Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), France; Center for cooperative research in biosciences (CICbioGUNE), Espagne; Innovative Diagnostic (IDvet), France; Boehringer Ingelheim International (BI), France ; Université de Nottingham (UNOTT), Royaume-Uni; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), CISA-INIA, Espagne ; Wageningen Bioveterinary Research (WBVR), Pays-Bas, Université de Pretoria (UP), Afrique du Sud; Université de Surrey (UoS), Royaume-Uni; Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Sénégal ; Laboratoire central vétérinaire (LCV), Espagne
- ⇒ Objectifs : Développer des vaccins innovants et des tests de diagnostic compagnon pour trois maladies animales prioritaires figurant sur la liste des maladies terrestres à déclaration obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) : la peste équine (AHS), la peste des petits ruminants (PPR) et la fièvre aphteuse (FA)
- ⇒ Recrutement et encadrement d'une chargée de projet de recherche: Philippine Toneatti (CDD 36 mois)

2021-2024: Coordinatrice du projet **ERA-NET ICRAD** (International Coordination of Research on Infectious Animal Diseases) intitulé « *From proteogenomic host response signatures of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection to diagnostic markers and therapeutic control* » Acronyme: **FMDV_PersIstOmics** et WP2 leader : *Markers of FMDV persistence*

- ⇒ Convention : 210087, durée du projet : 36 mois, démarrage : 31 Mars 2021
- ⇒ Coordination : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Collaborations : Université suédoise des sciences agricoles (SLU), Suède; Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Allemagne ; Sciensano, Belgique ; SAP Institute, Turquie
- ⇒ Objectifs : Déterminer les mécanismes moléculaires permettant l'établissement et le maintien d'une infection persistante par le virus de la fièvre aphteuse chez les ruminants afin d'améliorer le diagnostic des animaux porteurs asymptomatiques et de développer des outils thérapeutiques pour

empêcher cette persistance ou mettre fin à l'infection.

- ⇒ Recrutement et encadrement d'une chargée de projet post-doctorante: Caroline Michaud (CDD 22 mois)
- ⇒ Co-supervision de la thèse d'Ignacio Alvarez (doctorant SLU Suède ; 2021-2025)
- ⇒ Valorisation : Communications orales (2, 3 et 13) et 1 communication affichée (4)

2020-2023 : Participation au Projet ANR intitulé, "*Preparedness and Response in an Emergency context to Pathogens of MEDical and VETerinary importance* " Acronyme: **PrepMedVet**

- ⇒ Convention : 200219, durée du projet : 36 mois, démarrage : 1er Octobre 2020
- ⇒ Co- Coordination : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)/ Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Federal Research Institut for Animal Health, Anne Pohlmann
- ⇒ Collaborations : Friedrich-Loeffler-Institut (FLI); Bernhard Nocht Institut for Tropical Medicine (BNITM); French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES: Maisons-Alfort et Ploufragan)); Aix-Marseille Université (AMU)
- ⇒ Objectifs : Le projet PREPMedVet vise à fournir un outil universel, rapide et mobile permettant l'identification des agents pathogènes, ainsi qu'une production rapide à grande échelle et une validation des capacités de diagnostic adaptées i.e à la fois faciles à utiliser et donc accessibles également aux utilisateurs finaux. Notre équipe BIOPIC ainsi que l'équipe BIOR (biologie des orbivirus) est impliquée dans le développement d'une plateforme mobile de séquençage.
- ⇒ Recrutement et encadrement d'une chargée de projet post-doctorante: Mathilde Gondard (CDD 22 mois)
- ⇒ Valorisation : Communication orale (9)

2020 - 2023 Responsable du projet de thèse intitulé « *Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféactomique » chez 4 espèces cibles (Bos taurus, Ovis aries, Capra hircus et Sus scrofa)* » Acronyme: **PersIFA**

- ⇒ Fonctionnement : Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Financement de thèse : ½ financement ANSES + ½ financement ED ABIES (Concours Juin 2020)
- ⇒ Collaboration : équipe I5 de l'UMR virologie (Dr Damien Vitour), SLU (Pr Jean-François Valarcher), Biopôle ENVA (Pr Gregory Jouvion)
- ⇒ Objectifs : Comparer les interactions protéines-protéines (IPP) établies entre les protéines du virus de FA de sérotype O et les protéines codées par les 16 principaux gènes de la voie IFN dont les produits sont ciblés par les virus, chez trois espèces sensibles au virus FA (le bovin domestique *Bos taurus*, la chèvre *Capra Hircus* et le mouton *Ovis aries*) ou ne persiste pas (le porc *Sus scrofa*).
- ⇒ Encadrement de doctorant : Morgan Sarry
- ⇒ co-direction de thèse: Sandra Blaise-Boisseau et Labib Bakkali Kassimi
- ⇒ Valorisation : Mémoire de thèse ; Articles scientifiques (1, 3, 4 et 5) ; Communications orales (4, 6, 7, 8, 11,12, 14) ; Communications affichées (1, 2, 3, 8, 11, 14)

2020: Responsable du projet de Master 2 intitulé « Effet d'un inhibiteur de la réponse Interféron (IFN) de type I sur la persistance du virus de la fièvre aphteuse dans un modèle de cellules épithéliales bovines »

- ⇒ Fonctionnement : RP
- ⇒ Indemnité de stage de Master 2 : RP
- ⇒ Objectifs : Evaluer les effets du Ruxolitinib (inhibiteur spécifique de la cascade de signalisation JAK/STAT intervenant dans la réponse Interféron de type I) sur une infection persistante par un FMDV de sérotype O, établie dans des multicouches de DSP bovines.
- ⇒ Encadrement d'étudiant M2: Gael Penverne
- ⇒ Valorisation : Mémoire de master 2 et 1 communication affichée (4)

2019 : Participation au projet " Des modèles in vitro d'épithélium ovin pour étudier la pathogénèse

de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse" *Acronyme: Epithelov-FMDV*

- ⇒ Convention : CSENA2019 (Eve Laloy), durée du projet : 12 mois (02/01/2019 AU 31/12/2019)
- ⇒ Coordination/principale investigatrice : Eve Laloy, Maître de conférences en Anatomie pathologique Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie et Biopôle E NVA (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Collaborations : Université suédoise des sciences agricoles (SLU), Suède et Hôpital des animaux d'élevage de l'ENVA
- ⇒ Objectifs :
 - Reconstituer in vitro, à partir de prélèvements post-mortem d'amygdale, de palais mou dorsal et de poumon, des cultures de cellules épithéliales primaires, puis des modèles d'épithélium pluristratifié ovin (cellules épithéliales de l'amygdale et du palais mou dorsal uniquement).
 - Tester ensuite la capacité de ces cellules à être infectées par le FMDV (de sérotype O) et à héberger le virus de manière persistante.
- ⇒ Valorisation : 1 article scientifique soumis pour publication le 22/09/2023

2018: Responsable du projet de Master 2 intitulé « Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine»

- ⇒ Fonctionnement : convention 237B, durée du projet : 36 mois + extension 12 mois, démarrage : 1er Mars 2015
- ⇒ Indemnité de stage de Master 2 : convention 237B
- ⇒ Objectifs : Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine
- ⇒ Encadrement d'étudiant M2: Manon Borde
- ⇒ Valorisation : Mémoire de master 2 ; 1 communications orale (31) et 1 communication affichée (28)

2017-2019 : Coordinatrice du projet "Rapid, on site, diagnosis of FMD and safe and cost-effective shipment of samples using lateral flow devices for laboratory diagnostic "

Acronyme : LFD_FIELD_EVAL_INACT

- ⇒ Convention : 180043, durée du projet : 18 mois (02/10/2017 AU 01/03/2019)
- ⇒ Coordination : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Collaborations : DTU National Veterinary Institute, Institut vétérinaire national, Université technique du Danemark (DTU), Danemark; FMD Research Centre, Nat. Vet. Res. Inst. (NVRI), Nigeria; SAP/FMD Institute, Turkey, University of Malakand (UM), Pakistan; Merial Veterinary Public Health Center, Netherlands
- ⇒ Objectifs Evaluer le protocole d'envoi d'échantillons issus de cas suspects de fièvre aphteuse sur LFD inactivés, en utilisant des échantillons cliniques fraîchement collectés dans des pays endémiques, afin de valider la performance et la sécurité de l'ensemble du processus dans des conditions de terrain.
- ⇒ Valorisation : Rapport scientifique final du projet ; 1 article scientifique (2) ; communications orales (5, 16, 21, 24, 26) ; communications affichées (5, 10, 16, 22, 24, 26)

2017-2018 : Responsable du projet « Evaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le sérotypage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest » *Acronyme : FMDV-WA*

- ⇒ Convention : 170112, durée du projet : 12 mois (19/7/2017 AU 18/7/2018)
- ⇒ Coordination : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Collaborations : ISRA – LNERV (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires – LNERV), Dr Momar Talla SECK
- ⇒ Objectifs Evaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le sérotypage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest, sur un panel de prélèvements de terrain collectés au Sénégal
- ⇒ Accueil et encadrement de Gaye Laye DIOP
- ⇒ Valorisation : Rapport scientifique final du projet, communications orales (25, 47, 50 et 53) ; communication affichée (25)

2015-2019: Participation au projet européen ANIHWA, intitulé « Host response gene signatures associated with FMDV infection, vaccination and persistence », *Acronyme* : **Transcriptovac**

- ⇒ Convention : convention 237B, durée du projet : 36 mois + extension 12 mois, démarrage : 1er Mars 2015
- ⇒ Coordination : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Collaborations : Université suédoise des sciences agricoles (SLU), Suède; Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Allemagne ; Coda-Cerva, Belgique ; Inra (Jouy en Josas, VIM), vfMerial (France)
- ⇒ Objectifs : Etude des mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien de l'infection persistante par le FMDV dans un modèle de cellules épithéliales primaires bovines. Analyses des signatures transcriptomiques et approche interactomique.
- ⇒ Valorisation : Rapport scientifique final du projet ; 3 articles scientifiques (9, 10, 12) ; communications orales (20, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 36, 39, 42 et 46) ; communications affichées (23, 30, 35 et 38)

2016: Responsable du projet de Master 2 intitulé « Caractérisation des Interactions moléculaires virus-hôte au cours de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse »

- ⇒ Fonctionnement : convention 237B, durée du projet : 36 mois + extension 12 mois, démarrage : 1er Mars 2015
- ⇒ Indemnité de stage de Master 2 : convention 237B (Transcriptovac)
- ⇒ Encadrement d'étudiant M2: Sophie Bach et d'une stagiaire BTS (Naomi Ledey)
- ⇒ Collaborations : équipe (I5, « Innate Immunity, Interatomics and Interspecies transmission of viral Infections ») labellisée par le Labex IBEID dirigée par Damien Vitour au sein de l'UMR virologie.
- ⇒ Objectifs : Cartographier les interactions spécifiques virus-hôtes intervenant au cours de l'infection aiguë ou persistante de cellules bovines, en réalisant l'« interactome » complet du FMDV de type O isolat O/FRA/1/2001, par la méthode du double-hybride en levure.
- ⇒ Valorisation : Mémoire de master, mémoire de BTS ; Communications orales (39 et 42) ; communications affichées (35 et 37)

2014-2015 : Participation au projet "Use of Lateral Flow Device for safe and low cost shipment of FMDV suspected samples " *Acronyme* : **FMDVINACT**

- ⇒ Convention : 230B, durée du projet : 6 mois (24/10/2014 AU 31/03/2015)
- ⇒ Responsable du projet : Labib Bakkali Kassimi, Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort, France)
- ⇒ Objectifs : Mettre au point une méthode rentable et sûre pour l'expédition des échantillons de fièvre aphteuse, (i) basée sur l'inactivation du virus de la fièvre aphteuse (FMDV) sur bandelette de test LFD « lateral Flow Disease » (LFD, test couramment utilisé sur le terrain pour l'immunodétection rapide du FMDV) et (ii) permettant la détection et le typage ultérieurs du virus par RT-PCR et la récupération du virus vivant après transfection de l'ARN dans des cellules permissives.
- ⇒ Valorisation : Rapport scientifique final du projet ; 1 article scientifique (14) ; communications orales (32, 35, 37, 40 et 45) ; communications affichées (32, 39 et 42)

2011-2014 : Responsable du projet de thèse intitulé « Etude des déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse »

- ⇒ Fonctionnement : Ressources propres du laboratoire
- ⇒ Financement de thèse : financement ANSES 100%
- ⇒ Objectifs : Etudier les facteurs viraux et/ou cellulaires impliqués dans l'établissement et le maintien de la persistance du virus de la fièvre aphteuse, notamment en développant deux outils : (i) un modèle cellulaire d'infection persistante par le FMDV (ii) un système de génétique inverse du FMDV
- ⇒ Encadrement de doctorant : Lela Kopliku
- ⇒ co-direction de thèse: Sandra Blaise-Boisseau et Labib Bakkali Kassimi

- ⇒ Valorisation : Mémoire de thèse ; Article scientifique (18) ; Communications orales (52 et 55 ; communications affichées (40, 44, 50, 51, 52, 53 et 56)

2010-2013 : Participation au WP5 “detection” (responsable de la tâche “virus”), du projet “Bio-preparedness measures concerning prevention, detection and response to animal bio-terrorism threats” dans le cadre du Programme européen : Prevention of fight against crime 2007-2013 (ISEC 2009) *Acronyme* : **AniBioThreat**

- ⇒ Fonctionnement : convention A 121 A, durée du projet : 36 mois (01/10/ 2010 – 30/09/2013)
- ⇒ Objectifs du projet : Améliorer la capacité de l'UE à contrer les menaces de bioterrorisme animal en termes de sensibilisation, de prévention et d'urgence.
- ⇒ Objectifs du WP5/Tâche 3 Virus : Développer un test moléculaire multiplex basé sur la technologie Luminex liquid array pour la détection rapide, en une seule réaction et à partir d'un seul échantillon, des sept sérotypes différents du virus de la fièvre aphteuse, une épizootie majeure et un agent potentiel de bioterrorisme.
- ⇒ Co-Coordination : Institut National Vétérinaire (SVA), Suède et Institut Central Vétérinaire (CVI), Pays-Bas
- ⇒ Collaborations : Agence française de sécurité sanitaire des aliments, AFSSA; Institut vétérinaire national, Université technique du Danemark (DTU), Danemark; Direction des médicaments vétérinaires (DVMP), Hongrie
- ⇒ Recrutement et encadrement d'une chargée de projet post-doctorante: Aude Allemandou (CDD 30 mois)
- ⇒ Valorisation : Communications orales (58, 59 et 61) ; communications affichées (59, 60 et 63)

2009-2013 : Participation au projet “Development, enhancement and complementation of animal-sparing, foot-and-mouth disease vaccine-based control strategies for free and endemic regions” *Acronyme* : **FMD-DISCONVAC**

- ⇒ Fonctionnement : convention A 1700, durée du projet : 36 mois (01/04/ 2009 – 30/06/2013)
- ⇒ Coordination : Coda-Cerva, Belgique
- ⇒ Collaborations : Institut pour la santé animale (IAH), United Kingdom; Institut Central Veterinaire (CVI), Pays-Bas ; Institut zooprophylactique expérimental de Lombardie et d'Émilie-Romagne (IZSLER), Italie ; Institut Friedrich Loeffler (FLI) ; Allemagne ; Institut de recherche vétérinaire de Lanzhou (LVRI) ; Fondation pour l'interaction entre les entreprises et le secteur de l'éducation, de la science et de la technologie (FUNPRECIT), Argentine ; Agence française de sécurité sanitaire des aliments, AFSSA ; Office vétérinaire fédéral (OVF) du Département fédéral de l'économie (DFE), Suisse ; Ministère de l'agriculture-Institut vétérinaire Kimron(KVI), Israël ; Université de Glasgow (UGLA), United Kingdom ; Institut vétérinaire national, Université technique du Danemark (DTU), Danemark ; Merial S.A.S. (Merial), France
- ⇒ Objectifs du projet : (i) améliorer la qualité des vaccins et des diagnostics existants contre la fièvre aphteuse, (ii) affiner et remplacer les tests de qualité des vaccins in vivo, (iii) développer une nouvelle génération de vaccins et de diagnostics contre la fièvre aphteuse grâce à une technologie de pointe, (iv) et accroître/améliorer nos connaissances sur la propagation et la transmission du virus de la fièvre aphteuse suite à l'utilisation de vaccins monovalents ou multivalents très puissants dans des environnements indemnes et endémiques (v) étudier le rôle de la faune sauvage (buffles, gazelles et sangliers) dans le maintien et la transmission du virus de la fièvre aphteuse
- ⇒ Implication de l'équipe dans le cadre de ce projet : « Développement d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse » (WP5, Task 3) ; Mise au point et évaluation chez la souris et le porc de vaccins contre la fièvre aphteuse pouvant être produits en toute sécurité à l'aide d'un virus atténué de l'encéphalomyocardite (EMCV) exprimant la capsidie entière du virus de la fièvre aphteuse.(WP4.2)
- ⇒ Encadrement d'une étudiante M2 : Emilye Leboucher, co-encadrement d'un étudiant en M2 : Issam Belahj, encadrement d'1 étudiante en L3 : Hind Chouibani et de 3 étudiants en BTS : Julie Peter, Cécile Fajardi et Alban Lacaze
- ⇒ Valorisation : Rapports de M2, rapports de BTS, 1 article scientifique (21), Communications orales (56, 64, 65, 66, 67 et 68) ; communications affichées (54, 57, 61, 65, 66 et 67)

2008-2009 : Participation au projet ANR-07-PNRA-008 « Contamination de matrices alimentaires par

des virus entériques : relations entre propriétés de surface, capacité d'adhésion et résistance induite aux traitements technologiques et hygiéniques » *Acronyme* : **ADHERESIST**

- ⇒ Fonctionnement : convention D 7701, durée du projet : début Janvier 2008 pour 36 mois
- ⇒ Coordination : Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME) UMR 7564 Université Henri Poincaré Nancy 1 / CNRS
- ⇒ Collaborations : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de L'environnement et du Travail (Anses) ; Adria Normandie ; Institut Pasteur de Lille (IPL) ; Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Dijon ; Unité Mixte de Technologie TERESA « Transfert pour l'Expertise des Risques En Sécurité de l'Alimentation » dans le cadre de son Action 1 «Virus Alimentaires », associant AFSSA LERQAP (Unité VAE) et ADRIA Normandie.
- ⇒ Objectifs du projet : i) de mettre en relation propriétés de surface de différents virus modèles et capacité d'adhésion ; ii) d'évaluer la résistance des virus adhérents à des traitements technologiques et hygiéniques appliqués sur site de production ; iii) de proposer un germe de référence représentatif des principaux pathogènes et utilisable pour une évaluation en routine de l'efficacité virucide d'un traitement technologique.
- ⇒ Encadrement d'une chargée de projet-ingénieure: Sarah Temmam (CDD Adria Normandie, UMT Teresa)

2006-2009: Participation au projet « Improved biotraceability of unintended micro-organisms and their substances in food and feed chains », (programme européen FP6-2006-Food-036272, <https://cordis.europa.eu/project/id/36272>) *Acronyme* : **Biotracer**

- ⇒ Fonctionnement : Conventions : D1779 et D5677
- ⇒ Coordination : Institut vétérinaire national, Université technique du Danemark (DTU), Danemark
- ⇒ Collaborateurs impliqués pour la partie eaux embouteillées : University de Ljubljana (UL), biotechnical faculty, Slovénie ; Institut Supérieur de la Santé (ISS) et Société COOP Italia ; Italie
- ⇒ Objectifs du projet : Mise au point d'une méthode pour la détection moléculaire du virus de l'hépatite A dans l'eau minérale embouteillée
- ⇒ Valorisation : Article scientifique (24)

2006-2009 : Co-responsable du projet « Thermo-inactivation des virus contaminant les fruits rouges surgelés importés d'Europe Centrale (potentiel synergique du pH) » *Acronyme* : **ACTIA 05.7** ;

- ⇒ Fonctionnement : convention D9603, durée du projet : Janvier 2006 - Juin 2009
- ⇒ Coordination : ADRIA-Normandie
- ⇒ Collaborations : Agence française de sécurité sanitaire des aliments, AFSSA, LERQAP, unité VAE ; Institut Pasteur de Lille (IPL) ; Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME) UMR 7564 Université Henri Poincaré Nancy 1 / CNRS Unité Mixte de Technologie TERESA « Transfert pour l'Expertise des Risques En Sécurité de l'Alimentation » dans le cadre de son Action 1 «Virus Alimentaires », associant AFSSA LERQAP (Unité VAE) et ADRIA Normandie.
- ⇒ Partenaires industriels : Diana Végétal, Kerry Ravifruit, Les Vergers Boiron
- ⇒ Objectifs du projet : 1) Réaliser des recherches novatrices permettant de mieux connaître les propriétés de surface des particules virales et de mieux comprendre le comportement de ces particules au sein de matrices complexes. 2) Déterminer les cinétiques de thermo-inactivation du virus de l'hépatite A inoculé expérimentalement dans des purées de fruits (myrtilles, fraises, framboises) présentant différents niveaux d'acidité. 3) Evaluer un éventuel effet synergique sur l'inactivation virale d'un couplage traitement thermique / acidification des purées. 4) Sélectionner et adapter des modèles mathématiques permettant de prédire, en utilisant les données expérimentales obtenues, l'inactivation virale à un temps de traitement donné, en fonction de la température et du pH. 5) Valider cet outil de prédiction.
- ⇒ Encadrement d'une chargée de projet-ingénieure: Sarah Temmam (CDD Adria Normandie, UMT Teresa)
- ⇒ Valorisation : Communications affichées (69,70) ; et article scientifique (22)

2005-2009 : Participation au projet « Détection et caractérisation des virus entériques dans les aliments et l'eau » *Acronyme* : **Virenteric**

- ⇒ Fonctionnement : Ressources propres du laboratoire

- ⇒ Objectifs du projet : Développer / optimiser et caractériser des méthodes de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments. Etudier plus particulièrement la possibilité d'utiliser le bactériophage MS2 comme contrôle universel des diagnostics de détection des virus entériques à partir de prélèvements (eaux, aliments).
- ⇒ Encadrement d'une assistante ingénieure: Catherine Hennechart -Collette
- ⇒ Valorisation : Communication affichée (68) ; Article scientifique (23)

ACTIVITE DE FORMATION PAR LA RECHERCHE

■ Participation à l'encadrement de doctorants

2021-2025 (en cours) : Thèse en co-supervision SLU/Anses/FLI

Doctorant : **Ignacio Alvarez** (financement ICRAD)

Lieu : Université suédoise des sciences agricoles (SLU), Suède et formations/séjours scientifiques à l'Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité des Virus Entériques (Maisons-Alfort)

Titre du projet de thèse: « *Understanding the pathogenesis of bovine influenza D virus infection and foot-and-mouth disease virus persistence* »

2020-2023 (en cours) : Thèse soutenue le 18 septembre 2023

Responsable du projet de thèse PersIFA (Encadrante de thèse)

Doctorant : **Morgan SARRY** (Bourse Anses-AgroPariTech)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort)

Intitulé du Projet de thèse : « *Persistence du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféromique » chez 4 espèces cibles (Bos taurus, Ovis aries, Capra hircus et Sus scrofa) »*

Université AgroParisTech, Ecole doctorale ABIES

2011-2014 : Thèse soutenue le 17 octobre 2014

Encadrante de thèse (directeur de thèse : Labib Bakkali Kassimi)

Doctorante : **Lela KOPLIKU** (Bourse Anses)

Lieu : Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie (Maisons-Alfort)

Mémoire de thèse intitulé: « *Etude des déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse* »

Université PARIS DIDEROT (Paris 7), Ecole doctorale B3MI

2016-2018 : Thèse soutenue le 17 Décembre 2018

Co-encadrante de thèse (direction de thèse : Labib Bakkali Kassimi et Renaud Lancelot)

Doctorant : **Arada Izzedine ABDEL-AZIZ** (financement Anses/CIRAD)

Lieux : CIRAD, UMR ASTRE, Montpellier, France ; Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Maisons-Alfort, France ; Institut de Recherches en Élevage pour le Développement (IRED), N'Djamena, Tchad

Mémoire de thèse intitulé: « *Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse en Afrique Subsaharienne : cas du Tchad* »

Université AgroParisTech, Ecole doctorale ABIES

2010-2013 : Thèse soutenue le 10 novembre 2017

Co-encadrante de thèse (direction de thèse : Prof. Marc T.T. KPODEKON, directeur de Ecole polytechnique d'Abomey-Calavi)

Doctorante : Evelynne HOUNDJÉ (financement Institut de médecine tropicale d'Anvers et Ecole

polytechnique d'Abomey-Calavi)

Lieux : Ecole polytechnique d'Abomey-Calavi, Bénin (EPAC)

Mémoire de thèse intitulé: « *Epidémiologie de la fièvre aphteuse au Bénin et essais de lutte par la vaccination et les plantes médicinales* »

Institut de médecine tropicale d'Anvers et Ecole polytechnique d'Abomey-Calavi

▪ Responsable de l'encadrement d'étudiants

2023 Etudiante vétérinaire, année A3, double cursus ENS/ENV, promotion 2026 (6

semaines de stage volontaire)

Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort

Stagiaire : **Clara Pigozzo**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Participation aux activités de recherche sur le virus de la fièvre aphteuse »

2023 BTS Bioanalyses et contrôles 1ère année (6 semaines de stage)

Lycée Uruguay-France, Avon

Stagiaire : **Jade Moulin** (co-encadrée par Caroline Michaud, chargée de projet post-doctorante)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « *Evaluation d'un prototype de RT-PCR multiplex en temps réel pour le diagnostic de la persistance du virus de la fièvre aphteuse chez le bovin* »

2023 Master 1 Biologie Moléculaire et Cellulaire (3 mois)

UFR Sciences du vivant, Université Paris Cité

Stagiaire : **Estelle Koulmann** (co-encadrée par Morgan Sarry, doctorant 3^{ème} année)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage (format affiche) : « *Cartographie des domaines d'interaction de la 3D polymérase du virus de la fièvre aphteuse avec des protéines de la voie Interféron de type I* »

2022 BTS Bioanalyses et contrôles 1ère et 2ème année (6 puis 8 semaines de stage)

Lycée Grégor Mendel, Vincennes

Stagiaire : **Enzo Di Luca** (co-encadré par Morgan Sarry, doctorant 2nde puis 3^{ème} année)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage: « *Evaluation de l'efficacité d'anticorps pour la détection de protéines de la voie Interféron de type I (IFN I) bovines, porcines, ovines ou caprines et mise au point d'une expérience d'immunoprécipitation* »

2022 3ème année de Licence Sciences de la vie - Parcours : Biochimie, biologie intégrative et physiologie (B2IP) (14 jours de stage volontaire)

UFR Sciences du vivant, Université Paris Cité

Stagiaire : **Estelle Koulmann** (co-encadrée par Caroline Michaud, post-doctorante et Morgan Sarry, doctorant 2nde année)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Objet du stage: « *Suivi des activités de recherche sur le virus de la fièvre aphteuse au travers d'un projet européen et d'un projet de thèse. Mise en pratique des connaissances en virologie et initiation à de nouvelles techniques expérimentales en laboratoire NSB2 et NSB3* »

2020 Master 2 Ecole de Biologie Industrielle (EBI), (6 mois)

Ecole de Biologie Industrielle (EBI), Cergy

Stagiaire : **Gael Penverne** (co-encadré par Eve Laloy)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)
Intitulé du rapport de stage : « *Effet d'un inhibiteur de la réponse IFN de type I sur la persistance du virus de la fièvre aphteuse* »

2019 Stage d'observation de 3^{ème} (1 semaine)

Collège Blaise Pascal, Villemoisson sur Orge

Stagiaire : **Anaëlle Lachin**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage (format affiche) : « *Découverte d'un laboratoire de recherche en santé animale* »

2018 BTS Bioanalyses et contrôles 1^{ère} et 2^{ème} année (6 puis 8 semaines de stage)

Lycée Grégor Mendel, Vincennes

Stagiaire : **Lucie Da Cunha**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « *Etude d'interactions protéines-protéines entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule hôte bovine* »

2018 3^{ème} année de licence SIAS : Sciences Interdisciplinaires Appliquées à la Santé (2 semaines de stage volontaire)

Université Paris Diderot, Paris

Stagiaire : **Robin Clochard**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Objet du stage : « *Etude d'interactions protéines-protéines entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule hôte bovine* »

2018 Ingénieure d'étude, projet ADECIA action réf 17/30 (2 semaines de stage)

ISRA-LNERV (Dakar, Sénégal)

Stagiaire : **Gaye Laye Diop**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de projet : « *Evaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le typage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest.* »

2018 Master 2 Biologie Santé mention Microbiologie – Immunologie, (5 mois, gratification, projet Transcriptovac)

Université de Montpellier

Stagiaire : **Manon Borde** (co-encadrée par Eve Laloy)

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « *Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine* »

2017 BTS Bioanalyses et contrôles 1^{ère} et 2^{ème} année (6 puis 8 semaines de stage)

Lycée Grégor Mendel, Vincennes

Stagiaire : **Quentin Richard**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « *Développement d'outils pour la validation des interactions moléculaires entre les protéines du virus de la fièvre aphteuse et les protéines cellulaires bovines* »

2016 Stage de découverte du laboratoire- Terminale Scientifique (1 semaine de stage)

Lycée Jean-Baptiste Corot, Savigny sur Orge

Stagiaires : **Raphael et Florian Bertin**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Sujet du stage : « Découverte du travail de recherche en virologie au sein du laboratoire de santé animale »

2016 BTS Bioanalyses et contrôles 1ère et 2ème année (6 puis 8 semaines de stage)

Lycée Grégor Mendel, Vincennes

Stagiaire : **Naomi Ledey**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Interactions moléculaires entre virus de la fièvre aphteuse et cellule hôte bovine dans le contexte d'une infection persistante »

2016 Master 2 Sciences du vivant- Biologie des micro-organismes : parcours virologie, (5 mois, projet Transcriptovac)

Université de Strasbourg

Stagiaire : **Sophie Bach**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Caractérisation des interactions moléculaires virus-hôte au cours de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse »

2013-2014 BTS Bioanalyses et contrôles 1ère et 2ème année (6 puis 8 semaines de stage)

École technique supérieure du laboratoire (ETSL), Paris

Stagiaire : **Alban Lacaze**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Développement et évaluation d'outils pour le diagnostic et l'étude du virus de la fièvre aphteuse »

2013 BTS Bioanalyses et contrôles 2ème année (8 semaines de stage)

Lycée Grégor Mendel, Vincennes

Stagiaire : **Camille Roublot**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Développement d'un test RT-PCR multiplex pour le diagnostic et le typage des souches du virus de la fièvre aphteuse en Afrique de l'Ouest »

2012-2013 BTS Bioanalyses et contrôles 1ère et 2ème année (6 puis 8 semaines de stage)

École technique supérieure du laboratoire (ETSL), Paris

Stagiaire : **Cécile Fajardi**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Mise au point d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse »

2011 Master 2 Biologie – Santé, parcours : agents infectieux : interactions avec leurs hôtes et l'environnement (a2i) (6 mois)

Université de Versailles/ Saint Quentin en Yvelines

Stagiaire : **Emilye Leboucher**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Développement d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse »

2010 L3 Sciences de la Vie et de la Terre (8 semaines de stage)

Université Paris 12 Val de Marne, Créteil

Stagiaire : **Hind Chouibani**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Production et purification de protéines recombinantes à partir du virus de la fièvre aphteuse en vue de mettre au point un diagnostic sérologique multiplex basé sur la technologie luminex »

2009 BTS Bioanalyses et contrôles 2ème année (8 semaines de stage)

Lycée Grégor Mendel, Vincennes

Stagiaire : **Julie Peter**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Production et purification de protéines recombinantes du virus de la fièvre aphteuse pour la mise au point d'un test de diagnostic sérologique multiplex. »

2009 Master 2 Master 2 Pro Biologie Cellulaire et Moléculaire (6 mois)

Université de Cergy-Pontoise

Stagiaire : **Issam Belhaj**

Lieu : Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR Virologie, Equipe BIOPIC (Maisons-Alfort)

Intitulé du rapport de stage : « Etude de la maturation de la protéine de capsid du virus de la fièvre aphteuse (FMDV) »

▪ **Enseignement et actions de formation**

Activités d'enseignement :

Depuis 2013 : en charge annuellement du cours sur « *les Picornavirus* » pour les étudiants vétérinaires de l'ENVA

2014-2018 : Intervention annuelle pour un cours sur « *la fièvre aphteuse* » dans le cadre du module « Circulation des agents pathogènes et maladies infectieuses et parasitaires animales » dans le cadre du M2-UVSQ –Paris Saclay « Master 2 Recherche Agents Infectieux : Interactions Avec Leurs Hôtes Et L'environnement (A2i) »

2012 : Cours portant sur le « *Virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et infections inter-espèces* » dans le cadre d'un module de l'école doctorale B3MI

2010, 2012 et 2014 : Cours portant sur le « *Diagnostic des maladies vésiculeuses animales virales* » dans le cadre du Cours de Virologie Systématique de l'Institut Pasteur

Participation à la formation doctorale :

Jury de thèse

Examinatrice pour la thèse de Lena Kleij

Université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants SDSV

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire

Titre de la thèse : « Identification et validation des déterminants de virulence des virus influenza équins circulants »

Date de soutenance : 11 décembre 2023

Référente pour l'école doctorale ABIES

Formation en septembre 2019 par l'école doctorale ABIES

Référente pour les comités de suivi de thèse de 3 doctorant(-e)-s depuis 2020 (Madeleine De Sousa Violante, Paprapach Wongdontree et Quentin Chaillot)

Mentor pour le programme "Mentorat Femmes & Sciences" (Paris-Saclay)

Ce programme de mentorat "femmes et sciences" a été créé pour accompagner les doctorantes et les inciter à construire leur projet de carrière, en réfléchissant aux possibilités et aux choix qui s'ouvrent à elles avec l'aide de personnes d'expérience et de confiance qui seront leurs mentors.

=> 3 doctorantes mentorées depuis 2021 Ophélie McIntosh, Julie le Naour et Emilie Pacheco)

2002-2004 : Participation à la formation de stagiaires /co-encadrement

François Helle, étudiant du DEA " Bases fondamentales de l'oncogénèse" de l'université Paris 7 (de Janvier à Juillet 2004) : formation et assistance pour la réalisation de la partie expérimentale du stage.

Co-encadrement de Anne Tyvaert, étudiante de l'Institut National Agronomique de Paris Grignon, lors de son stage de deuxième année (Juillet-Août 2002) : formation et assistance pour la réalisation de la partie expérimentale et la rédaction de son mémoire de stage

Co-encadrement de Philippe Afonso, étudiant du Magistère de biologie-biochimie de l'Ecole Normale Supérieure de Paris, lors de son stage de licence (Juillet-Août 2002) : formation et assistance pour la réalisation de la partie expérimentale du stage

AUTRES ACTIVITES

▪ Activités de référence

L'équipe BIOPIC est LNR, LR-OIE, LRUE et centre de référence FAO. Elle a également participé, jusqu'en 2020, au mandat de LRUE pour les maladies équine pour la stomatite vésiculeuse (maladie virale indiscernable cliniquement de la FA chez les ruminants et le porc notamment). Afin de fournir des services de diagnostic de qualité, l'équipe mène ses activités de diagnostic sous assurance qualité avec des méthodes accréditées selon la norme ISO 17025.

Participation aux activités du LNR FA

Dans le cadre des activités du LNR Fièvre aphteuse (FA), Maladie vésiculeuse du porc (MVP) et du mandat LRUE Stomatite vésiculeuse (SV), j'ai participé dès ma prise de fonction dans l'UMR Virologie en 2009, aux missions d'AST suivantes et jusqu'en 2011.

- Acquisition de compétences pour les diagnostics sérologique et virologique de la FA, MVP et SV
- Bilan et mise à jour des réactifs de diagnostic
- Participation aux EILA organisés par le laboratoire de Pirbright
- Participation à un exercice d'alerte FA en contexte de pandémie H1N1 organisé par l'AFSSA (Novembre 2009)
- Réalisation des analyses sérologiques FA dans le cadre d'enquêtes ou d'exportation,
- Réalisation des analyses sérologiques et virologiques (MVP, SV)
- Mise en place de l'assurance qualité en vue d'une demande d'accréditation COFRAC (FA, MVP)

Participation aux activités du LRUE maladies équine

Entre 2014 et 2019 j'ai participé aux activités du LRUE maladies équine pour la stomatite vésiculeuse (SV) avec notamment le développement d'un test de diagnostic sérologique par technologie luminex et de tests Elisa. J'ai présenté ces travaux lors du Workshop LRUE équin en 2016 et ces résultats ont aussi été présentes en Argentine lors du congrès WAVLD (World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians) en 2016.

Participation aux activités du LRUE FA

En 2019, dans le cadre de notre nomination en tant que LRUE pour la fièvre aphteuse, il m'a été confié, dans l'optique de l'EILA LRUE de mettre en place le protocole d'inactivation du virus de la FA par le éthylèneimine binaire (binary éthylèneimine, BEI). Avec ma collègue Aurore Romey, assistante ingénieure en charge notamment de l'EILA FA, nous avons pu établir un mode opératoire permettant de constituer les panels de virus inactivés destinés aux laboratoires participants non habilités à manipuler le virus de la fièvre aphteuse vivant. Ce protocole a ainsi été utilisé avec succès pour les 4 EILA déjà organisés depuis 2019. Depuis 2019 et notre nomination LRUE FA, je participe activement aux activités du LRUE : (i) l'organisation et l'animation des WS depuis 2019 (pour l'édition 2022 j'ai notamment présenté des données sur les méthodes de transfection des ARN du virus FMDV (pour « ressusciter » des virus) qui s'est prolongée par une table ronde sur ce sujet), (ii) l'animation des management meetings, (iii) l'organisation des EILA et (iiii) la rédaction du Rapport d'activités LRUE Côté activités de recherche de référence, j'ai participé à la

validation de la méthode de détection moléculaire de la FA en RT-PCR triplex en temps réel et je supervise un technicien (**Anthony Relmy**) pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux anti FA et le développement concomitant de tests Elisa de compétition.

▪ **Activités d'expertise**

Evaluatrice/relectrice de manuscrits pour des revues internationales à comité de lecture (14 articles scientifiques depuis 2015)

Viruses (viruses-690034, viruses-935175, viruses-1371979, viruses-1462262, viruses-1185215, viruses-1829546)

BMC biotechnology (ID 1faad074-e520-4530-84e5-3a5dc17bd567)

PlosOne (PONE-D-21-13407)

Vaccines (Vaccines-975547)

Transboundary and emerging diseases (TBED-OA-563-18)

VirusDisease (INJV-D-15-00075)

Brazilian Journal of Microbiology (BJMI-D-22-01225)

Veterinary Research Communications (ID e8163879-27d1-422d-ab33-aa28e0dfdbf6)

Scientific Reports (ID 20867121-0607-4704-b86b-5567eaa58ac4)

2005-2009 : Membre du groupe de travail CEN (CEN/TC275/WG6/TAG4, « detection of viruses in food »). La dernière réunion de ce groupe s'est déroulée les 1^{er} et 02 Octobre 2008, à Londres.

2005-2009 : Membre du groupe miroir "virus" (GT virus de la commission de normalisation V08B), piloté par Soizick Le Guyader (suivi des travaux du CEN/TC > 275/WG 6/TAG 4). La dernière réunion de ce groupe s'est déroulée le 07 Février 2008, à Nantes (IFREMER).

Participation en tant que membre du GT virus « miroir » à la réunion de la commission de normalisation « microbiologie des aliments », le 18 mars 2008 à l'AFNOR (Seine Saint-Denis).

Participation et présentation orale lors de la journée AFSSA « Eaux de consommation et santé humaine », au Siège de l'Afssa Maisons Alfort, le 4 Juillet 2008.

Sociétés savantes et conseil scientifique :

Membre de la SFV depuis 2011

Membre de la SFM (Société Française de Microbiologie) de 2007 à 2009

Membre du conseil scientifique de l'ADRIA Normandie, à Villers Bocage, le 26 Septembre 2008.

▪ **Autres**

▪ **Surveillance, vigilance, alerte**

- L'équipe Biopic fait partie de la cellule alerte fièvre aphteuse dont la responsable est Gina Zanella, vétérinaire épidémiologiste (Unité d'épidémiologie, LSAn). Ce système d'alerte fièvre aphteuse en France met en œuvre une veille permanente (24h/24 ; 7j/7) via une ligne téléphonique dédiée pour la validation des suspicions cliniques de fièvre aphteuse.
- Si la suspicion est validée par les épidémiologistes (d'après photos et commémoratifs), le virologue de garde prend le relais pour mettre en place l'acheminement des prélèvements et mobiliser l'équipe d'analystes d'astreinte pour réaliser les analyses et fournir un diagnostic dans les meilleurs délais.
- Je suis virologue de garde pour la fièvre aphteuse depuis ma prise de fonction en 2009 et assure la suppléance de Labib Bakkali Kassimi. J'ai participé dans ce cadre à la gestion de suspicions vraies ou d'exercices visant à vérifier le maintien de nos capacités en terme

d'efficacité, disponibilité, réactivité et qualité des résultats rendus. Ces dernières années, j'ai eu notamment à gérer une suspicion de FA en juin 2017, que nous avons pu lever après analyses de laboratoire. Plus récemment, en avril 2019, j'ai participé aux analyses dans le cadre d'une suspicion dans les Comores, laquelle révélée fondée. Avec l'équipe nous avons pu isoler et caractériser rapidement la souche en cause dans ce foyer.

FORMATIONS

▪ Formation complémentaire diplômante

2010 Cours de virologie Fondamentale, Institut Pasteur, obtention du DU de Virologie fondamentale (2011)

▪ Formation continue

2021 Management transversal

2021 Maintien et actualisation des compétences SST

2020 Cadre déontologique de l'Anses

2019 Atelier de microscopie confocale

2017 Formation aux techniques d'études des interactions protéine-protéine

2017 Online FMD Laboratory investigation training course

2014 Management de projet

2015 Microscopie de fluorescence : bases et nouveautés

2014 Vector NTI

2013 Phylogénie moléculaire

2012 Anglais (Télélangue)

2012 Encadrement de doctorant

2009 Perfectionnement Analyses de séquences (Bioinformatique 2)

2009 Risques biologiques

2009 Biostatistiques de base 1

2009 Préparation à l'habilitation à la conduite d'autoclaves

2008 Utilisation de l'application Sapphire (LIMS)

2007 Analyse Bio-informatique de séquences nucléiques et protéiques (Bioinformatique1)

2006 Prise de parole en anglais niveau 2

2006 Formation laboratoire P3

2006 Communication pharmaceutique et médicale en anglais scientifique

VALORISATION

▪ Publications scientifiques

33 Articles dans des revues à comités de lecture :

- 1) Sarry M., Bernelin-Cottet M., Michaud C., Relmy, A., Romey A., Salomez A.-L., Renson P., Contrant M., Berthaud M., Huet H., Jouvion G., Hägglund S., Valarcher J.-F, Bakkali Kassimi L and Blaise-Boisseau S. **2023.** Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, *Accepté pour publication le 6 septembre 2023 in press*
- 2) Romey A., Ullaramu H. G., Bulut A., Jamal S. M., Khan S., Ishaq M., Eschbaumer M., Belsham G. J., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Gondard M., Benfrid S., Wungak Yiltawe S., Hamers C., Hudelet P., Zientara S., Bakkali Kassimi L. and Blaise-Boisseau S. **2023.** Field evaluation of a safe, easy and low-cost protocol for shipment of samples from suspected cases of foot-and-mouth disease to diagnostic laboratories. **Transbound Emerg Dis.**, vol. 2023, Article ID 9555213. doi.org/10.1155/2023/9555213.

- 3) Sarry M, Caignard G, Dupré J, Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **2023**. Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway. **Viruses**. Mar 1;15(3):666. doi: 10.3390/v15030666.
- 4) Sarry, M., Vitour, D., Zientara, S., Bakkali Kassimi, L., Blaise-Boisseau, S. **2022**. Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model. **Viruses**. 14, no. 10: 2129. doi.org/10.3390/v14102129.
- 5) Sarry M., Romey A., Lefebvre D., Benfrid S., Dufour B., Durand B., Zanella G., De Regge N., Zientara S.; Bakkali Kassimi L. et Blaise-Boisseau S. **2022**. Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogenèse, diagnostic et surveillance [Foot and mouth disease virus: transmission, pathogenesis, diagnosis and surveillance] **Virologie (Montrouge)**. 26(5):355-373. doi:10.1684/vir.2022.0972.
- 6) Canini L, Blaise-Boisseau S, Wadsworth J, Nardo AD, Shaw A, Romey A, Relmy A, Bernelin-Cottet C, Salomez AL, Haegeman A, Ularamu H, Lefebvre D, De Clercq K, Mioulet V, Brocchi E, Pezzoni G, Nfon C, King D, Durand B, Knowles N, Kassimi LB, Benfrid S. **2022**. Identification of diffusion routes of O/EA-3 topotype of foot-and-mouth disease virus in Africa and Western Asia between 1974 and 2019 - a phylogeographic analysis. **Transbound Emerg Dis**. Sep;69(5):e2230-e2239. doi: 10.1111/tbed.14562.
- 7) Romey A, Lamglait B, Blanchard Y, Touzain F, Quenault H, Relmy A, Zientara S, Blaise-Boisseau S, Bakkali-Kassimi L. **2021**. Molecular characterization of encephalomyocarditis virus strains isolated from an African elephant and rats in a French zoo. **J Vet Diagn Invest**. 2021 Mar;33(2):313-321. doi: 10.1177/1040638720978389.
- 8) Lagrée AC, Fasani F, Rouxel C, Pivet M, Pourcelot M, Fablet A, Romey A, Caignard G, Vitour D, Blaise-Boisseau S, Kieda C, Boulouis HJ, Haddad N, Grillon C. **2020**. Bovine Organospecific Microvascular Endothelial Cell Lines as New and Relevant In Vitro Models to Study Viral Infections. **Int J Mol Sci**. Jul 24;21(15):5249. doi: 10.3390/ijms21155249.
- 9) Jouneau L, Lefebvre DJ, Costa F, Romey A, Blaise-Boisseau S, Relmy A, Jaszczyszyn Y, Dard-Dascot C, Déjean S, Versillé N, Guitton E, Hudelet P, Curet M, De Clercq K, Bakkali-Kassimi L, Zientara S, Klonjowski B, Schwartz-Cornil I. **2020**. The antibody response induced FMDV vaccines in sheep correlates with early transcriptomic responses in blood. **NPJ Vaccines**. Jan 3;5(1):1. doi: 10.1038/s41541-019-0151-3.
- 10) Häggglund S, Laloy E, Näslund K, Pfaff F, Eschbaumer M, Romey A, Relmy A, Rikberg A, Svensson A, Huet H, Gorna K, Zühlke D, Riedel K, Beer M, Zientara S, Bakkali-Kassimi L, Blaise-Boisseau S, Valarcher JF. **2020**. Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate. **Transbound Emerg Dis**. Jan;67(1):133-148. doi: 10.1111/tbed.13332.
- 11) Abdel-Aziz AI, Romey A, Relmy A, Gorna K, Laloy E, Métras R, Muñoz F, Blaise-Boisseau S, Zientara S, Lancelot R, Bakkali Kassimi L. 2020. Seroprevalence and molecular characterization of foot-and-mouth disease virus in Chad. **Vet Med Sci**. Feb;6(1):114-121. doi: 10.1002/vms3.206.
- 12) Pfaff F, Häggglund S, Zoli M, Blaise-Boisseau S, Laloy E, Koethe S, Zühlke D, Riedel K, Zientara S, Bakkali-Kassimi L, Valarcher JF, Höper D, Beer M, Eschbaumer M. **2019**. Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus. **Viruses**. Jan 12;11(1). pii: E53. doi: 10.3390/v11010053.
- 13) Blisnick AA, Šimo L, Grillon C, Fasani F, Brûlé S, Le Bonniec B, Prina E, Marsot M, Relmy A, Blaise-Boisseau S, Richardson J, Bonnet SI. **2019**. The Immunomodulatory Effect of IrSPI, a Tick Salivary Gland Serine Protease Inhibitor Involved in Ixodes ricinus Tick Feeding. **Vaccines (Basel)**. Oct 12;7(4). doi: 10.3390/vaccines7040148
- 14) Romey A, Relmy A, Gorna K, Laloy E, Zientara S, Blaise-Boisseau S, Bakkali Kassimi L. **2018**. Safe and cost-effective protocol for shipment of samples from Foot-and-Mouth Disease suspected cases for laboratory diagnostic. **Transbound Emerg Dis**. Feb;65(1):197-204. doi: 10.1111/tbed.12648.
- 15) Breard E, Garnier A, Despres P, Blaise Boisseau S, Comtet L, Viarouge C, Bakkali-Kassimi L, Pourquier P, Hudelet P, Vitour D, Rossi S, Belbis G, Sailleau C, Zientara S. **2017**. Development of a Double-Antigen Microsphere Immunoassay for Simultaneous Group and Serotype Detection of Bluetongue Virus Antibodies. **Transbound Emerg Dis**. Dec;64(6):1837-1847. doi: 10.1111/tbed.12578.
- 16) Gorna K, Relmy A, Romey A, Zientara S, Blaise-Boisseau S, Bakkali-Kassimi L. **2016**. Establishment and validation of two duplex one-step real-time RT-PCR assays for diagnosis of foot-and-mouth disease. **J Virol Methods**. Sep;235:168-175. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.020.
- 17) Sánchez-Matamoros A, Beck C, Kukiélka D, Lecollinet S, Blaise-Boisseau S, Garnier A, Rueda P, Zientara

- S, Sánchez-Vizcaíno JM. **2016**. Development of a Microsphere-based Immunoassay for Serological Detection of African Horse Sickness Virus and Comparison with Other Diagnostic Techniques. **Transbound Emerg Dis.** Dec;63(6):e270-e277. doi: 10.1111/tbed.12340.
- 18) Kopliku L, Relmy A, Romey A, Gorna K, Zientara S, Bakkali-Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **2015**. Establishment of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection in MDBK cells. **Arch Virol.** Oct;160(10):2503-16. doi: 10.1007/s00705-015-2526-8.
 - 19) Beck C, Desprès P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N, Durand B, Garnier A, Blaise-Boisseau S, Guitton E, Yamanaka T, Zientara S, Lecollinet S. **2015**. A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. **Biomed Res Int.** 2015:678084. doi: 10.1155/2015/678084.
 - 20) Gorna K, Houndjè E, Romey A, Relmy A, Blaise-Boisseau S, Kpodékon M, Saegerman C, Moutou F, Zientara S, Bakkali Kassimi L. **2014**. First isolation and molecular characterization of foot-and-mouth disease virus in Benin. **Vet Microbiol.** Jun 25;171 (1-2):175-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.003.
 - 21) Carocci M, Cordonnier N, Huet H, Romey A, Relmy A, Gorna K, Blaise-Boisseau S, Zientara S, Kassimi LB. **2011**. Encephalomyocarditis virus 2A protein is required for viral pathogenesis and inhibition of apoptosis. **J Virol.** Oct;85(20):10741-54. doi: 10.1128/JVI.00394-11.
 - 22) Deboosere, N., Pinon, A., Delobel, A., Temmam, S., Morin, T., Merle, G., Blaise-Boisseau, S., Perelle, S. and Vialette, M. **2010**. A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A virus in acidified berries. **Food Microbiol.** 27(7): 962-967. doi: 10.1016/j.fm.2010.05.018.
 - 23) Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., and Perelle S. **2010**. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. **J. Virol. Methods.**, 166:48-53. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.02.017.
 - 24) Perelle, S., Cavellini, L., Burger, C., Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Merle, G. and Fach, P. 2009. Use of a robotic RNA purification protocol based on the Nuclisens® easyMAGTM for real-time RT-PCR detection of hepatitis A virus in bottled water. **J. Virol. Methods.** 157:80-83. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.11.022.
 - 25) Malassiné, A., Frendo, J.L., Blaise, S., Handschuh, K., Gerbaud, P., Tsatsaris, V., Heidmann, T. and Evain-Brion, D. **2008**. Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. **Retrovirology**, 5 :6. doi: 10.1186/1742-4690-5-6.
 - 26) Malassiné, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D. and Heidmann, T. **2007**. Expression of the fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. **Placenta** 28 (2-3): 185-191. doi: 10.1016/j.placenta.2006.03.001
 - 27) Kfutwah, A.K., Mary, J.Y., Nicola M.A., Blaise-Boisseau, S., Barré-Sinoussi, F., Ayoub, A. and Menu, E. **2006**. Tumour necrosis factor- α stimulates HIV-1 replication in single-cycle infection of human term placental villi fragments in a time, viral dose and envelope dependant manner. **Retrovirology**. Jun 23; 3:36. doi: 10.1186/1742-4690-3-36.
 - 28) Dewannieux, M.; Blaise, S. and T. Heidmann. **2005**. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of Human Endogenous Retroviruses. **J. Virol.** 79:15573-15577. doi: 10.1128/JVI.79.24.15573-15577.2005.
 - 29) De Parseval N., Diop G., Blaise S., Helle F., Vasilescu A., Matsuda F. and T. Heidmann. **2005** Comprehensive search for intra- and inter-specific sequence polymorphisms among coding envelope genes of retroviral origin found in the human genome : genes and pseudogenes. **BMC Genomics.** 6:117. doi: 10.1186/1471-2164-6-117.
 - 30) Blaise S, de Parseval N and T. Heidmann. **2005**. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. **Retrovirology**. 2 :19. doi: 10.1186/1742-4690-2-19.
 - 31) Blaise, S., A. Ruggieri, M. Dewannieux, F.-L. Cosset, and T. Heidmann. **2004**. Identification of an envelope protein from the FRD family of Human Endogenous Retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity on retroviral particles and functional conservation among simians. **J. Virol.** 78:1050-1054. doi: 10.1128/jvi.78.2.1050-1054.2004.
 - 32) Blaise, S., N. de Parseval, L. Bénit, and T. Heidmann. **2003**. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. **Proc. Natl.**

Acad. Sci. USA. 100:13013-13018. doi: 10.1073/pnas.2132646100.

- 33) Blaise, S., Mangeney, M. and Heidmann, T. **2001**. The envelope of the Mason Pfizer Monkey Virus has immunosuppressive properties, **J. Gen. Virol.**, 82:1597-1600. doi: 10.1099/0022-1317-82-7-1597.

3 publications nationales et/ou actes de colloque

- 34) Relmy A., Romey A., Gorna K., Blaise-Boisseau S., Laloy E., Meenowa D., Samois K., Harena R., Ram R., Aboo J., Cardinale E., Sailleau C., Lecollinet S., Zientara S. et Bakkali Kassimi L. **2017**. Crise sanitaire dans l'océan indien : virus de la fièvre aphteuse aux îles Maurice et Rodrigues en 2016. **Épidémiol. et santé anim.**, 71, 117-127.
- 35) Relmy A, Romey A, Toms D, Gorna K, Zientara S, Swenson S, Blaise-Boisseau S., Bakkali-Kassimi L. **2016**. Development of a Luminex Immunoassay for the serological diagnosis of Vesicular Stomatitis (VS) and Comparison with the Virus Neutralization Test (VNT). **J Equine Vet Science**, 39 (supplement), 10,9. doi:10.1016/j.jevs.2016.02.019. (conference abstract)
- 36) Houndjè E., Kpodekon M., Moutou F., Blaise-Boisseau S., Bakkali-Kassimi L., Berkvens D., Zientara S., Saegerman C. **2013**. Principales caractéristiques épidémiologiques et impact économique de la fièvre aphteuse en Afrique: synthèse bibliographique. **Ann. Méd. Vét.**, 157, 120-134

1 Chapitre d'ouvrage :

- 37) Blaise-Boisseau S., Romey A. and Bakkali Kassimi L. **Molecular detection of animal viral pathogens. Chapitre 9:** Porcine Encephalomyocarditis virus. Edited by Dongyou Liu, Taylor & Francis Group. Edited by Dongyou Liu, Taylor & Francis Group. August 9, **2016**

▪ **Rapports**

- 1) Perelle S., Temmam S., Merle G., Blaise-Boisseau S. **2009**. Rapport scientifique final du projet ACTIA 05.7 (Janvier 2006 - Novembre 2008) « Thermo-inactivation des virus contaminants les fruits rouges surgelés importés d'Europe Centrale (effet synergique du pH) ».
- 2) Perelle S., Temmam S., Burger C., Blaise-Boisseau S. **2009**. Rapport scientifique final du projet ACTIA 06.9 (Septembre 2006 - Septembre 2008) « Efficacité des peroxydes sur la destruction virale, utilisation potentielle comme désinfectants et auxiliaires technologiques

▪ **Communications orales à des congrès et conférences (Orateur ; Invitation*)**

- 1) Blaise-Boisseau S*. *Molecular Interplays of FMDV with IFN Response and Importance of the Model* Scientific Meeting of the Global Foot and Mouth Disease Research Alliance (GFRA), Kampala, (Ouganda), 8-10 Novembre **2023**. (invitée)
- 2) Michaud, C., Alvarez, I., Litz, B., Landmesser, A., Romey, A., Huet, H., Bernelin, C., Salomez, A.-L., Relmy, A., Zientara, S., Pfaff, F., Bakkali Kassimi, L., Eschbaumer, M., Valarcher, J.-F., Hägglund, S. and Blaise-Boisseau, S. *Leaderless FMDV O does not establish a persistent infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate*. Scientific Meeting of the Global Foot and Mouth Disease Research Alliance (GFRA), Kampala, (Ouganda), 8-10 Novembre **2023**.
- 3) Litz, B., Sehl-Ewert, J. Landmesser, A., Pfaff, F., Romey, A., Blaise-Boisseau, S., Beer, M. and Eschbaumer. *Leaderless FMDV is fully attenuated in vivo and unable to establish persistent infection*. Junior Scientist Symposium 2023, Jena, 13 Novembre **2023**
- 4) Litz, B., Landmesser, A., Pfaff, F., Blaise-Boisseau, S. and Eschbaumer, M. *Leaderless FMDV O is fully attenuated in cattle and does not establish persistent infections*. Scientific Meeting of the Global Foot and Mouth Disease Research Alliance (GFRA), Kampala, (Ouganda), 8-10 Novembre **2023**.
- 5) Sarry, M., Bernelin-Cottet, C., Michaud, C., Relmy, A., Romey, A., Salomez, A.-L., Huet, H., Jouvion, G., Hägglund, S., Valarcher, J.-F., Bakkali Kassimi, L. and Blaise-Boisseau, S. *Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis*. International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, ISWAVLD, Lyon

(France). 29 juin- 1er Juillet **2023**.

- 6) Romey A., Ularanu, H.-G, Bulut A., Jamal S. M., Khan S., Ishaq M., Eschbaumer M., Belsham G. J., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Gondard M., Benfrid S., Wungak Y. S., Hamers C., Hudelet P., Zientara S., Bakkali Kassimi L. and Blaise-Boisseau S. *Field evaluation of a safe and cost-effective shipment of FMDV suspected samples to diagnostic laboratories using lateral flow devices*. International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, ISWAVLD, Lyon, (France). 29 juin- 1er Juillet **2023**.
- 7) Sarry, M., Caignard, G., Dupré, J., Zientara, S., Vitour, D., Bakkali Kassimi, L. and Blaise-Boisseau, S. *Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?* 15th EPIZONE Annual Meeting, Novi-Sad, (Serbie), 26-28 Avril **2023**.
- 8) Sarry, M., Caignard, G., Dupré, J., Zientara, S., Vitour, D., Bakkali Kassimi, L. et Blaise-Boisseau, S. *Interaction hôte spécifique de la polymérase 3Dpol du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I.* ». XXVIèmes journées francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France) 17-18 avril **2023**
- 9) Sarry, M., Benfrid, S., Bernelin-Cottet, C., Relmy, A., Romey, A., Salomez, A.-L., Caignard, G., Zientara, S., Vitour D., Bakkali Kassimi, L. and S. Blaise-Boisseau. *Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?* Open session EUFMD 2016 Marseille (France), 26-28 Octobre **2022**
- 10) Gondard M., Benfrid S., Bréard E., Touzain F., Blanchard Y., Vorimore F., Delannoy S., Fach P., Blaise-Boisseau, S., Bakkali Kassimi L. et S. Zientara. *Amélioration des capacités de surveillance en virologie : Séquençage de génomes viraux d'intérêt vétérinaire (Projet ANR PrepMedVet)*. JSDA Maisons-Alfort, (France), 19 Octobre **2022**.
- 11) Blaise-Boisseau S et Romey A. *Discussion on Transfection Methods Success (Roundtable)*, FMD EURL WorkShop, Marne La Vallée, (France), 27-28 Septembre **2022**.
- 12) Sarry, M., Bernelin-Cottet, C., Relmy, A., Romey, A., Salomez, A.-L., Caignard, G., Zientara, S., Vitour, D., Bakkali Kassimi, L. and Blaise-Boisseau S. *FMDV 3D interference with innate immunity*. FMD EURL WorkShop, Marne La Vallée, (France), 27-28 Septembre **2022**.
- 13) Sarry, M., Benfrid S., Bernelin-Cottet C., Relmy, A., Romey, A., Salomez A.-L., Caignard, G. Zientara, S., Vitour D., Bakkali Kassimi L. and S. Blaise-Boisseau. *Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?* 12ième congrès international de l' European Society of Veterinary Virology (ESVV), Gand (Belgique), 20-23 septembre **2022**.
- 14) Michaud, C., S. Inel Turgut, P. Tuncer Göktuna, C. Çokçalışkan, A. Romey, S. Häggglund, J-F. Valarcher, B. Litz, F. Pfaff, M. Eschbaumer, S. Zientara, L. Bakkali Kassimi and S. Blaise-Boisseau. *Persistence du virus de la fièvre aphteuse : De la signature transcriptomique de la réponse de l'hôte aux marqueurs diagnostiques*. Journée des doctorants & des post-doctorants ENVA, Maisons-Alfort, (France), 20 septembre **2022**.
- 15) Sarry M., Benfrid S., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Romey A., Salomez A.L., Caignard G., Zientara S., Vitour D., Bakkali Kassimi L. et S. Blaise-Boisseau. *Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I (IFN I) : un lien avec la persistance virale ?* CIFMIA (visio). Colloque International Francophone en Maladies Infectieuses Animales (CIFMIA), Montreal (Canada), on-line, 6 et 13 mai **2022**.
- 16) Canini L., Blaise-Boisseau S., Wadsworth J., Di Nardo A., Shaw A.E., Romey A., Relmy A., Bernelin-Cottet C., Salomez A.L., Haegeman A., Ularanu H., Lefebvre D., De Clercq K., Mioulet V., Brocchi E., Pezzoni G., Nfon C., King D.P., Durand B., Knowles N.J., Bakkali Kassimi L. et Benfrid S. *Identification phylogéographique des routes de diffusion du virus de la fièvre aphteuse de topotype O/EA-3 en Afrique et en Asie Orientale de 1974 à 2019*. XXIVème Journées Francophones de Virologie, Strasbourg, (France), 11 et 12 avril **2022**.
- 17) Bakkali Kassimi L., Belsham G.J., Benfrid S., Bernelin-Cottet C., Bulut A.N., Eschbaumer M., Hamers C., Jamal S.M., Relmy A., Romey A., Ularanu H.G., Wungak Y.S, Zientara S. and Blaise-Boisseau S. *Field evaluation of a safe and cost-effective shipment of FMD suspected samples to diagnostic laboratories using lateral flow devices*. EAVLD, on-line, 17 Novembre **2021**.
- 18) Bernelin-Cottet C., Benfrid S., Salomez A.-L., Romey A., Relmy A., Zientara S., Blaise-Boisseau S. and Bakkali Kassimi L. *Development and validation of a one-step triplex real-time rt-pcr assay for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus*. EAVLD, on-line, 17 Novembre **2021**.

- 19) Bernelin-Cottet C., Benfrid S., Salomez A.-L., Romey A., Relmy A., Zientara S., Blaise-Boisseau S. and Bakkali Kassimi L. *Development and validation of a one-step triplex real-time rt-pcr assay for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus*. Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance (GFRA) conference, on-line, 1-3 Novembre **2021**.
- 20) Benfrid S., Canini L., Delannoy S., Tran Mai-Lan, Blaise-Boisseau S., Wadsworth J., Di Nardo A., Shaw A., Romey A., Relmy A., Bernelin-Cottet C., Salomez A.L., Haegeman A., Ullaramu H. , Lefebvre D., De Clerck K., Mioulet V., Brocchi E. , Pezzoni G. , King D. , Durand B. , Knowles N. & Bakkali Kassimi L. *Reconstruction phylogénétique de l'histoire du topotype O/EA-3 du virus de la fièvre aphteuse en Afrique (1974-2019)*. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, Maisons-Alfort (France), par visioconférence, 22 septembre **2021**.
- 21) Blaise-Boisseau S., Hägglund S., Laloy E., Näslund K. , Pfaff F., Eschbaumer M., Romey A. , Relmy A. ,Huet, H., Benfrid S., Bernelin-Cottet C. , Salomez A.-L. , Beer M. , Zientara S. , Bakkali-Kassimi L. and J.-F. Valarcher. *Modèle d'infection persistante de cellules épithéliales primaires de nasopharynx bovin par le virus de la fièvre aphteuse et analyse transcriptionnelle de la réponse de l'hôte*. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, Maisons-Alfort, (France), par visioconférence, 3 septembre **2020**.
- 22) Romey, A., Bakkali Kassimi L, Belsham, G.J., Bulut A.N., Hamers, C. , Hudelet, P., Jamal, S., Laloy, E., Relmy, A., Ullaramu H.G., Zientara, S. and Blaise-Boisseau S. *Rapid, on site, diagnosis of FMD and safe and cost-effective shipment of samples using lateral flow devices for laboratory diagnostic*. 13ième congrès Epizone, Berlin (Allemagne) 26-28 Août **2019**.
- 23) Pfaff, F., S Hägglund, M Zoli, S Blaise-Boisseau, E Laloy, S Koethe, D Zühlke, K Riedel, S Zientara, L Bakkali-Kassimi, J-F Valarcher, D Höper, M Beer, M Eschbaumer. *Gene Signatures Associated with Foot-And-Mouth Disease Virus Infection and Persistence Part II: Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Cells*. 13ième congrès Epizone, Berlin (Allemagne) 26-28 Août **2019**.
- 24) Laloy E., Hägglund S., Näslund K., Pfaff F., Eschbaumer M., Romey A. , Relmy A. ,Huet, H. , Gorna K. , Beer M. , Zientara S. , Bakkali-Kassimi L., Blaise-Boisseau S. and Valarcher J.-F. *Un épithélium pluristratifié dérivé du palais mou bovin comme modèle d'infection persistante par le virus de la fièvre aphteuse*. Journée de la Recherche, ENVA, Maisons-Alfort, (France), 4 juin **2019**.
- 25) Romey, A., Ullaramu H.G., Bulut A.N., Jamal, S., Belsham, G.J., Hamers, C., Hudelet, P., Gorna, K., Laloy, E., Relmy, A., Zientara, S., Bakkali Kassimi L, et Blaise-Boisseau S. *Du terrain au laboratoire de référence : évaluation d'un protocole pour l'envoi à faible coût et sans risque infectieux de prélèvements issus de cas suspects de fièvre aphteuse*. XXlèmes Journées francophones de virologie, Lyon, (France), 28-29 mars **2019**
- 26) Gorna, K., Diop GL., Diop M., Laloy, E., Lo MM., Relmy, A., Romey, A., Seck MT., Ullaramu H.G., Zientara, S., Blaise-Boisseau S. and Bakkali Kassimi L. *Development and evaluation of a multiplex classical rt-pcr for simultaneous detection and typing of fmdv in West Africa*. 5th EAVLD congrès, Bruxelles, (Belgique), 14-17 octobre **2018**.
- 27) Bakkali Kassimi L, Belsham, G.J., Bulut A.N., Gorna, K., Hamers, C., Hudelet, P., Jamal, S., Laloy, E., Relmy, A., Romey, A., Ullaramu H.G., Zientara, S. and Blaise-Boisseau S. *Rapid, on site, diagnosis of FMD and safe and cost-effective shipment of samples using lateral flow devices for laboratory diagnostics*. EUFMD 2018 open Session, Borgo Egnazzia, (Italie), 29-31 Octobre **2018**.
- 28) Hägglund S., Laloy E., Näslund K. , Pfaff F., Eschbaumer M., Romey A. , Relmy A. ,Huet, H. , Gorna K. , Beer M. , Zientara S. , Bakkali-Kassimi L., Blaise-Boisseau S. and Valarcher J.F. *Gene signatures associated with foot-and-mouth disease virus infection and persistence, Part I: Persistent FMDV infection in an air-liquid interface model of bovine soft palate*. EUFMD 2018 open Session, Borgo Egnazzia, (Italie), 29-31 Octobre **2018**.
- 29) Pfaff F., Hägglund S., Blaise-Boisseau S., Laloy E., Bakkali-Kassimi L., Romey A.3, Relmy A.3, Gorna K., Näslund K., Köthe S., Zühlke D., Riedel K. , Zientara S., Valarcher J.F., Höper D., Beer M., Eschbaumer M. *Gene signatures associated with foot-and-mouth disease virus infection and persistence, Part II: Transcriptomic analysis of acute and persistent fmdv infection in bovine soft palate*. EUFMD 2018 open Session, Borgo Egnazzia, (Italie), 29-31 Octobre **2018**.
- 30) Hägglund S., Laloy E., Näslund K. , Pfaff F., Eschbaumer M., Romey A. , Relmy A. ,Huet, H. , Gorna K. , Beer M. , Zientara S. , Bakkali-Kassimi L., Blaise-Boisseau S. and Valarcher J.F. *Gene signatures associated with foot-and-mouth disease virus infection and persistence, Part I: Persistent FMDV infection in an air-liquid interface model of bovine soft palate*. 2nd international Virus persistence meeting: mechanisms and

consequences, Freiburg, (Allemagne) 23-25 Août **2018**.

- 31) Pfaff F., Hägglund S., Blaise-Boisseau S., Laloy E., Bakkali-Kassimi L., Romey A.3, Relmy A.3, Gorna K., Näslund K., Köthe S., Zühlke D., Riedel K., Zientara S., Valarcher J.F., Höper D., Beer M., Eschbaumer M. *Gene signatures associated with foot-and-mouth disease virus infection and persistence, Part II: Transcriptomic analysis of acute and persistent fmdv infection in bovine soft palate*. 2nd international Virus persistence meeting: mechanisms and consequences, Freiburg, (Allemagne) 23-25 Août **2018**.
- 32) Borde, M., Richard, Q., Laloy, E., Caignard, G., Relmy, A., Romey, A., Gorna, K., Vitour, D., Zientara, S., Bakkali-Kassimi, L. et Blaise-Boisseau, S. *Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine*. Journée des doctorants ENVA, Maisons Alfort, (France), 5 juin **2018**.
- 33) Romey A., A. Relmy, K. Gorna, E. Laloy, S. Zientara, S. Blaise-Boisseau, L. Bakkali-Kassimi. *Use of lateral flow device for safe and cost-effective shipment of FMDV suspected samples*. GFRA scientific meeting, Séoul, (Corée du Sud), 25-27 octobre **2017**.
- 34) Blaise-Boisseau, S., Laloy, E., Hägglund, S., Näslund, K., Bach, S., Caignard, G., Romey, A. Relmy, A., Gorna, K., Kundlacz, C., Vitour, D., Zientara, S., Valarcher, J-F. et Labib Bakkali-Kassimi. *Fièvre aphteuse: interactions virus-hôte et persistance virale dans plusieurs modèles de cellules épithéliales bovines*. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, 25-26 octobre **2017**.
- 35) Blaise-Boisseau, S., Laloy, E., Hägglund, S., Näslund, K., Bach, S., Caignard, G., Romey, A. Relmy, A., Gorna, K., Kundlacz, C., Vitour, D., Zientara, S., Valarcher, J-F. and Labib Bakkali-Kassimi. *FMDV- Host interaction in a model of persistently infected bovine cells*. 11th EPIZONE Annual Meeting, Paris, (France), 19-21 September **2017**.
- 36) Romey A., A. Relmy, K. Gorna, E. Laloy, S. Zientara, S. Blaise-Boisseau, L. Bakkali-Kassimi. *Use of lateral flow device for safe and cost-effective shipment of FMDV suspected samples*. 11th EPIZONE Annual Meeting, Paris, (France), 19-21 Septembre **2017**.
- 37) Laloy, E., Blaise-Boisseau, S., Hägglund, S., Näslund, K., Huet, H., Caignard, G., Romey, A. Relmy, A. Gorna, K., Kundlacz, C., Vitour, D., Zientara, S., Valarcher, J-F. et Bakkali-Kassimi, L. *Fièvre Aphteuse : Interactions virus-hôte et persistance virale dans plusieurs modèles de cellules épithéliales bovines*. Journée de la Recherche, ENVA, Maisons-Alfort, (France), 27 juin **2017**.
- 38) Romey A., Relmy A., Gorna K., Laloy E., Zientara S., Blaise Boisseau S., Bakkali Kassimi L. *Use of lateral flow device for safe and cost-effective shipment of FMDV suspected samples*. 18th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Sorrento, (Italie), 7-10 Juin **2017**.
- 39) Relmy, A., Romey, A., Gorna, K., Blaise-Boisseau S., Meenowa, D., Samois, K., Rasamoelina, H., Cardinale, E., Sailleau, C., Lecollinet, S., Zientara, S. et Bakkali Kassimi, L. *Crise sanitaire dans l'océan indien : virus de la fièvre aphteuse aux îles Maurice et Rodrigues en 2016*. Journées scientifiques de l'Association pour l'étude de l'Epidémiologie des Maladies Animales (AEEMA), ENVA, 24 mars **2017**.
- 40) Blaise-Boisseau, S., Laloy, E., Hägglund, S., Näslund, K., Bach, S., Caignard, G., Romey, A. Relmy, A., Gorna, K., Kundlacz, C., Vitour, D., Zientara, S., Valarcher, J-F. and Labib Bakkali-Kassimi. *FMDV-Host interaction in a model of persistently infected bovine cells*. Open Session EUFMD, Cascais, (Portugal), 25-28 Octobre **2016**.
- 41) Romey A., Relmy A., Gorna K., Laloy E., Zientara S., Blaise Boisseau S., Bakkali Kassimi L. *Use of lateral flow device for safe and cost-effective shipment of FMDV suspected samples*. Open Session EUFMD, Cascais, (Portugal), 25-28 Octobre **2016**.
- 42) Gorna K., Relmy A., Romey A., Zientara S., Blaise-Boisseau S., Bakkali-Kassimi L. *Establishment and validation of two duplex one-step real-time RT-PCR assays for diagnosis of Foot-and-Mouth disease*. Open Session EUFMD, Cascais, (Portugal), 25-28 Octobre **2016**.
- 43) Blaise-Boisseau, S., Laloy, E., Hägglund, S., Näslund, K., Bach, S., Caignard, G., Romey, A. Relmy, A., Gorna, K., Kundlacz, C., Vitour, D., Zientara, S., Valarcher, J-F. and Labib Bakkali-Kassimi. *FMDV-Host interaction in a model of persistently infected bovine cells*. Meeting "Within Host RNA Virus persistence", St Andrews (Ecosse), 24-26 Aout **2016**.
- 44) A. Relmy, A. Romey, D. Toms, K. Gorna, S. Zientara, S. Swenson, S. Blaise-Boisseau, L. Bakkali-Kassimi. *Development of a Luminex Immunoassay for the serological diagnosis of Vesicular Stomatitis (VS) and*

Comparison with the Virus Neutralization Test (VNT). 10th International Equine Infectious Diseases Conference, Buenos Aires, (Argentina), 4-8 Avril **2016**.

- 45) Romey A., Blaise-Boisseau S. and L. Bakkali Kassimi. *Enquête sur la circulation du virus de l'EMCV dans les parcs zoologiques de France*. AFVPZ (Association Francophone des Vétérinaires de Parcs Zoologiques), Paris, (France), 18 Mars **2016**.
- 46) Romey A., Relmy A., Gorna K., Laloy E., Zientara S., Blaise Boisseau S., Bakkali Kassimi L (2015). *Use of lateral flow device for safe and low cost shipment of FMDV suspected samples*. Colloque GFRA Hanoi, (Vietnam), 20-22 Octobre **2015**.
- 47) Beer, M., K. De Clercq, D. Lefebvre, A. De Vleeschauwer, I. Schwartz- Cornil, J.-F. Valarcher, S. Hägglund , B. Haas, P. Hudelet, J. Richardson, B. Klonjowski, S. Blaise-Boisseau, L. Bakkali-Kassimi and S. Zientara. *ANIHWA PROJECT "TRANSCRIPTOVAC": Host response gene signatures associated with FMDV infection, vaccination and persistence*. 9ième meeting annuel Epizone, Montpellier (France), 2-3 Septembre **2015**.
- 48) Góna, K., A. Allemandou, C. Roublot, A. Relmy, A. Romey, S. Zientara, S. Blaise-Boisseau and L. Bakkali-Kassimi. *Development and evaluation of a multiplex classical RT-PCR for simultaneous detection and typing of FMDV in West Africa*. 9ième meeting annuel Epizone, Montpellier (France), 2-3 Septembre **2015**.
- 49) Relmy, A., A. Romey, K. Góna, S. Zientara, S. Blaise-Boisseau and L. Bakkali-Kassimi. *Development of a Luminex assay for the serological diagnosis of Vesicular Stomatitis virus*. 9ième meeting annuel Epizone, Montpellier (France), 2-3 Septembre **2015**.
- 50) Romey Aurore, Anthony Relmy, Kamila Góna, Sandra Blaise-Boisseau, Stéphan Zientara, Labib Bakkali Kassimi. *Emergence du virus de l'Encéphalomyocardite dans un zoo Français*. AFVPZ (Association Francophone des Vétérinaires de Parcs Zoologiques), Paris (France), 3 Juillet **2015**.
- 51) Gorna, K., A. Allemandou, C. Roublot, A. Romey, A. Relmy, S. Zientara, S. Blaise-Boisseau and L. Bakkali-Kassimi. *Développement et évaluation de la RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le sérotypage simultané du virus de la fièvre aphteuse*. XVIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris (France), 9-10 Avril **2015**.
- 52) Romey, A., B. Langlait, K. Lemberger, A. Relmy, K. Gorna, S. Blaise-Boisseau, S. Zientara and L. Bakkali-Kassimi (2015). *Emergence du virus de l'encéphalomyocardite dans un zoo français*. XVIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris (France), 9-10 Avril **2015**.
- 53) Kopliku L., Kamila G., Romey A., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. and S. Blaise-Boisseau. *Establishment of a persistent FMD virus infection in MDBK cells*. Open Session of the EuFMD, Cavtat, (Croatie), 29-31 October **2014**.
- 54) Kamila G., Allemandou A., Roublot, C., Romey A., Relmy, A., Zientara, S., Blaise-Boisseau, S. and Labib Bakkali Kassimi. *Development and evaluation of a multiplex conventional rt-pcr for simultaneous detection and typing of FMDV in West Africa*. Open Session of the EuFMD, Cavtat, (Croatie), 29-31 October **2014**.
- 55) Gorna K., Houndjè E., Romey A., Relmy A., Blaise-Boisseau S., Kpodékon M., Saegerman C., Moutou F., Zientara S. et L. Bakkali Kassimi. *Isolement et caractérisation moléculaire du virus de la fièvre aphteuse au Bénin en 2010*. 6ième Colloque International Francophone De Microbiologie Animale (CIFMIA), Toulouse, (France), 15-16 mai **2014**.
- 56) Kopliku L., Góna K., Relmy A., Romey A., Zientara S., Blaise-Boisseau S. et L. Bakkali Kassimi. *Etude des déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse*. 6ième Colloque International Francophone De Microbiologie Animale (CIFMIA), Toulouse, (France), 15-16 mai **2014**.
- 57) Blaise-Boisseau, S. Garnier, A., Allemandou, A., Relmy, A., Romey, A., Gorna, K., Zientara, S. and L. Bakkali Kassimi. *Development of a multiplex immunoassay for foot-and-mouth disease diagnostic*. Epizone, 7ième annual meeting Bruxelles (Belgique), 1er-4 Octobre **2013**.
- 58) Gorna, K., Houndje E., Romey A., Relmy, A., Blaise-Boisseau S., Kpodékon, M., Saegerman, C., Moutou, F., Zientara, S. and L. Bakkali Kassimi. *Isolation and molecular characterization of foot-and-mouth disease virus in Benin in 2010*. Epizone, 7ième annual meeting Bruxelles (Belgique), 1er-4 Octobre **2013**.
- 59) Allemandou, A., Romey, A., Gorna, K., Garnier, A., Relmy, A., Blaise-Boisseau, S., Zientara, S. and L. Bakkali-Kassimi. *Development of a single test for exclusion or Detection and typing of foot and mouth disease virus*. Epizone, 7ième annual meeting Bruxelles (Belgique), 1er-4 Octobre **2013**.

- 60) Allemandou A., S. Blaise-Boisseau, K. Gorna, A. Relmy, A. Romey, S. Zientara and L. Bakkali-Kassimi. *Development of a single test for exclusion or detection and typing of foot and mouth disease virus*. 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), Berlin (Allemagne), 6-8 Juin **2013**.
- 61) Gorna K., Houndjè E., Romey A., Relmy A., Blaise-Boisseau S., Kpodékon M., Saegerman C., Zientara S. and Bakkali-Kassimi L. *Isolement et caractérisation moléculaire du virus de la fièvre aphteuse au Bénin en 2010*. Journées scientifiques l'AEEMA (Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales), ENVA Maisons-Alfort, (France), 29-31 Mai **2013**.
- 62) Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Gorna K., Relmy A., Romey A., Bakkali-Kassimi L., Zientara S. *Développement d'un test multiplex pour la détection et le typage moléculaire du virus de la Fièvre Aphteuse*. XVèmes Journées Francophones de Virologie, Paris, (France), 14-19 avril **2013**.
- 63) Góna K., Romey A., Relmy A., Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Development and evaluation of a one-step duplex real time RT-PCR for diagnosis of foot and mouth disease*. Open session of the Standing Technical and research Committees of the EuFMD Commission, Jerez, (Espagne) 29-31 October **2012**.
- 64) Gorna K., Romey A., Relmy A., Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *A duplex one-step real time RT-PCR for diagnosis of foot and mouth disease*. Second Congress of EAVLD, Kazimierz Dolny, (Pologne), 1-4 Juillet, **2012**.
- 65) Carocci M., Gorna K., Relmy A., Romey A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Production of a safe EMCV-FMDV recombinant vaccine against FMD*. Epizone, building Bridges Workshop. Beijing, Chine, 2-4 Juillet **2011**.
- 66) Carocci M., Romey A., Relmy A., Gorna K., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Production d'un virus recombinant chimère EMCV-FA en vue de son utilisation comme vaccin marqueur contre la fièvre aphteuse*. 5ème colloque international francophone de microbiologie animale, Marrakech, (Maroc), 3-5 avril **2011**.
- 67) Blaise-Boisseau S., Guy M., Relmy A., Gorna K., Carocci M., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Development of a foot-and-mouth disease diagnostic multiplex immunoassay*. FMD Week 2010 – FMD: New tools and challenges for progressive control. Veterinary University of Vienna, (Autriche), 28 Septembre – 1er Oct octobre **2010**.
- 68) Carocci M., Guy M., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Production of a safe EMCV-FMDV recombinant vaccine against FMD*. FMD Week 2010 – FMD: New tools and challenges for progressive control. Veterinary University of Vienna, (Autriche), 28 Septembre – 1er Octobre **2010**.
- 69) Carocci M., Guy M., Relmy A., Gorna K., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *La délétion d'une partie de la protéine 2A de l'EMCV atténue son pouvoir neurovirulent*. XIIèmes Journées Francophones de Virologie, Paris, (France), 18-19 mars **2010**.
- 70) Blaise-Boisseau, S. *Développement d'un contrôle interne pour la détection du virus de l'hépatite A dans les aliments*. Journée de convergence Afssa-CEA, Siège de l'Afssa, Maisons-Alfort (France), le 31 mars **2009**.
- 71) Blaise-Boisseau, S. et Sylvie Perelle. *Virus et eaux : les techniques*. Journée « Eaux de consommation et santé humaine », Siège de l'Afssa, Maisons Alfort, (France), 4 Juillet **2008**.
- 72) Blaise-Boisseau, S. *Détection des Virus Entériques en Hygiène des Aliments*. Journées d'information FICT « virus et aliments », Paris (France), 9 Novembre **2006**.
- 73) Blaise-Boisseau, S.* *Food and Water Virology Research in France/Europe*. XXVIème International Workshop on Rapid Methods and Automation in Microbiology Manhattan Kansas (USA), le 14 Juillet **2006**. (*invitée*)
- 74) Blaise-Boisseau, S.* *Détection des Virus Entériques en Hygiène des Aliments*. 6ème colloque BioMérieux de Microbiologie Alimentaire, Marcy L'étoile, (France), 16 mai 2006. (*invitée*)
- 75) Blaise, S.* *Caractérisation fonctionnelle des protéines d'enveloppe des rétrovirus endogènes humains*. Institut Pasteur, Paris (France), le 6 Avril **2004**. (*invitée*)
- 76) Blaise, S. *Fonctionnalité des protéines d'enveloppe des rétrovirus endogènes humains*. Séminaire du club « Mob'île de France » à Jussieu, paris, (France), le 12 février **2002**.

- 77) Blaise, S. *Identification et caractérisation fonctionnelle des protéines d'enveloppe des rétrovirus endogènes humains.* Séminaire de l'IFR de l'Institut Gustave Roussy, Institut Gustave Roussy, Villejuif, (France), le 7 Mars **2003**.
- 78) Blaise, S. *Identification et caractérisation fonctionnelle des protéines d'enveloppe des rétrovirus endogènes humains.* Séminaire dans le cadre des journées de l'école doctorale de cancérologie, Roscoff, (France), le 2 février **2004**.

▪ **Communications affichées (Présentateur)**

- 1) Santry, M. Bernelin-Cottet, C., Michaud, C., Relmy, A., Romey, A., Salomez, A.-L., Huet, L., Jouvion, G., Hägglund, S., Valarcher, J.-F., Bakkali Kassimi, L. and Blaise-Boisseau, S. *Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis.* Scientific Meeting of the Global Foot and Mouth Disease Research Alliance (GFRA), Kampala, (Ouganda), 8-10 Novembre **2023**.
- 2) Santry, M. Bernelin-Cottet, C., Michaud, C., Relmy, A., Romey, A., Salomez, A.-L., Huet, L., Jouvion, G., Hägglund, S., Valarcher, J.-F., Bakkali Kassimi, L. and Blaise-Boisseau, S. *Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis.* 15th EPIZONE Annual Meeting, Novi-Sad, (Serbie), 26-28 Avril **2023**.
- 3) Santry, M. Bernelin-Cottet, C., Michaud, C., Relmy, A., Romey, A., Salomez, A.-L., Huet, L., Jouvion, G., Hägglund, S., Valarcher, J.-F., Bakkali Kassimi, L. et Blaise-Boisseau, S. *Développement d'un modèle de cellules épithéliales de palais mou dorsal porcin sensible à l'infection par le virus de la fièvre aphteuse.* XXVIèmes journées francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 17-18 Avril **2023**.
- 4) Laloy E., Hägglund S., Penverne G., Huet H., Näslund K., Romey A., Relmy A., Bernelin-Cottet C., Michaud C., Salomez A.L., Benfrid S., Zientara S., Bakkali Kassimi L., Valarcher J.F. and S. Blaise-Boisseau. *Effect of ruxolitinib on persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate.* Open session EUFMD 2016 Marseille, (France), 26-28 Octobre **2022**.
- 5) Romey A., Belsham G.J., Benfrid S, Bernelin-Cottet C., Bulut A.N., Eschbaumer M., Hamers C., Hudelet P., Jamal S.M., Relmy A., Ullaramu H.G., Wungak Y.S., Zientara S., Bakkali Kassimi L. and Blaise-Boisseau S. *Field evaluation of a safe and cost-effective shipment of FMDV suspected samples to diagnostic laboratories using lateral flow devices.* Open session EUFMD 2016 Marseille, (France), 26-28 Octobre **2022**.
- 6) Ahmed Al-Rawahi W., Wadsworth J. , Hicks H.M. , Knowles N.J. , Di Nardo A., King D.P., Benfrid S. , Blaise-Boisseau S., Gondard M. , Michaud C. , Relmy A., Romey A. , Salomez A.L., Santry M. , Zientara S. , Baqir S. , Elshafie I.E , Al-Ansari A., Bernelin-Cottet C. and L. Bakkali Kassimi. *First isolation, molecular detection and phylogenetic analysis of fmdv a/africa/g1 in the sultanate of Oman.* Open session EUFMD 2016 Marseille, (France), 26-28 Octobre **2022**.
- 7) Salomez A.L., Romey A., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Benfrid S., Santry M., Michaud C., Gondard M., Zientara S., Blaise-Boisseau S. and L. Bakkali Kassimi. *Validation of disinfection by directed and non-directed processes in the bsl3 laboratory handling live foot-and-mouth disease virus.* Open session EUFMD 2016 Marseille, (France), 26-28 Octobre **2022**.
- 8) Santry M., Benfrid S., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Romey A., Salomez A.L., Caignard G., Zientara S., Vitour D., Bakkali Kassimi L. et S. Blaise-Boisseau. *Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?* Anses scientific and doctoral days, Maisons-Alfort, (France), 18-19 Octobre **2022**.
- 9) Bernelin-Cottet C., Benfrid S., Relmy A., Romey A., Salomez A.L., Santry M., Laurentie M., Dekker A., Eschbaumer M., De Clercq K., Lefebvre D.J., Dezideriu Moțiu R., Pezzoni G., Ruano Ramos M.J., Steinrig A., Wood B., Zientara S., Blaise-Boisseau S. and L. Bakkali Kassimi. *Une nouvelle RT-PCR en temps réel triplex en une étape pour la détection des virus de la fièvre aphteuse.* Rencontres Nationales de Santé Publique Vétérinaire, Bourges, (France), 14 octobre **2022**.
- 10) Romey A., Ullaramu H.G., Bulut A.N., Jamal, S., Belsham, G.J., Hamers, C., Hudelet, P., Relmy, A., Bernelin-Cottet C., Benfrid S., Zientara, S., Bakkali Kassimi L, et Blaise-Boisseau S. *Du terrain au laboratoire de référence : Développement et évaluation d'un protocole pour l'envoi à faible coût et sans risque infectieux de prélèvements issus de cas suspects de fièvre aphteuse.* Rencontres Nationales de Santé Publique Vétérinaire, Bourges, (France), 14 octobre **2022**.

- 11) Sanry M., Benfrid S., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Romey A., Salomez A.L., Caignard G., Zientara S., Vitour D., Bakkali Kassimi L. et S. Blaise-Boisseau. *Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?* ESVV2022 12th International Congress For Veterinary Virology, Ghent, (Belgique), 20-23 Septembre, **2022**.
- 12) Di Nardo A., Wadsworth J., Bachanek-Bankowska K., Benfrid S., Blaise-Boisseau S., Delannoy S., Lasecka-Dykes L., Kasanga C.J., Shaw A.E., Mioulet V., Romey A., Relmy A., Fach P., Ullaramu H., Bakkali Kassimi L., King D.P. and Nick J. Knowles. Complete Genome Analyses of Foot-and-Mouth Disease Viruses Belonging to Serotypes O, A and SAT 2 in East, West and North Africa. XXIème Europic meeting, Harrogate, (UK), 5-9 juin **2022**.
- 13) Salomez A.L., Romey A., Relmy A., Bernelin-Cottet C., Benfrid S., Sanry M., Michaud C., Gondard M., Zientara S., Blaise-Boisseau S. et L. Bakkali Kassimi. *Validation de la désinfection par procédés dirigés et non dirigés en laboratoire NSB3 du virus de la Fièvre aphteuse*. XXIVèmes Journées Francophones de Virologie, Strasbourg, (France), 11 et 12 avril **2022**.
- 14) Sanry M., Benfrid S., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Romey A., Salomez A.L., Caignard G., Zientara S., Vitour D., Bakkali Kassimi L. et S. Blaise-Boisseau. *Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I: un lien avec la persistance virale ?* XXIVèmes Journées Francophones de Virologie, Strasbourg, (France), 11 et 12 avril **2022**.
- 15) Benfrid S. , LeFloc'h C. , Bernelin-Cottet C., Blaise-Boisseau S. , Sghaier S., Madani H., Bouayed N. , Ullaramu H. , Wungak Y. , Relmy A., Salomez A.L., Mioulet V., Romey A. and Bakkali Kassimi L. *Rapid and sensitive identification of the FMD A/Africa/G-IV lineage by a novel real-time RT-PCR assay*. EAVLD, on-line (e-poster), 17 Novembre **2021**.
- 16) Bakkali Kassimi L, Belsham G.J., Benfrid S, Bernelin-Cottet C, Bulut A.N., Eschbaumer M, Hamers C., Jamal S.M., Relmy A., Romey A., Ullaramu H.G., Wungak Y.S, Zientara S. and Blaise-Boisseau S. *Field evaluation of a safe and cost-effective shipment of FMD suspected samples to diagnostic laboratories using lateral flow devices*, Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance (GFRA) conference, on-line (e-poster), 1-3 Novembre **2021**.
- 17) Bakkali Kassimi L. and colleagues from the EU reference laboratory / eurl-fmd@anses.fr. *The new EU reference laboratory for foot-and-mouth disease: overview of activities conducted during the first three years*. Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance (GFRA) conference, on-line (e-poster), 1-3 Novembre **2021**.
- 18) Benfrid S., LeFloc'h C. , Bernelin-Cottet C., Blaise-Boisseau S. , Sghaier S. , Madani H., Bouayed N. , Ullaramu H. , Wungak Y. , Relmy A., Salomez A.L., Mioulet V., Romey A. and Bakkali Kassimi L. *Rapid and sensitive identification of the FMD A/Africa/G-IV lineage by a novel real-time RT-PCR assay*. Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance (GFRA) conference, on-line (e-poster), 1-3 Novembre **2021**.
- 19) Bernelin Cottet C., Relmy A., Salomez A.L., Romey A., Benfrid S., Zientara S., Blaise Boisseau S. et L. Bakkali Kassimi. *Développement d'une RT-PCR en temps réel une étape multiplex pour la détection du virus de la fièvre aphteuse (FMDV)*. (e-poster) XXIIIèmes Journées Francophones de Virologie (visio), Montpellier , (France), 26-27 avril **2021**.
- 20) Le Floc'h C., Benfrid S., Romey A., Bernelin-Cottet C., Relmy A., Salomez A.L., Zientara S., Blaise-Boisseau S., and L. Bakkali Kassimi. *Développement et évaluation d'un test de RT-PCR en temps réel pour la caractérisation du lignage A/AFRICA/G-IV du virus de la Fièvre Aphteuse*. (e-poster) XXIIIèmes Journées Francophones de Virologie (visio), Montpellier , (France), 26-27 avril **2021**.
- 21) Benfrid S., Blaise-Boisseau, S, Wadsworth J, Di Nardo A, Shaw A, Romey A, Relmy A, Fauchaux R, Mioulet V, King DP, Knowles NJ and Bakkali Kassimi L. *Molecular epidemiology of Foot-and-Mouth disease virus o/eA-3: a recent transboundary emergence in North Africa (2017-2019)*. GFRA, Bangkok, (Thaïlande) 29-31 Octobre **2019**.
- 22) Romey, A., Bakkali Kassimi L, Belsham, G.J., Bulut A.N., Hamers, C., Hudelet, P., Jamal, S., Laloy, E., Relmy, A., Ullaramu H.G., Zientara, S. and Blaise-Boisseau S. *Rapid, on site, diagnosis of fmd and safe and cost-effective shipment of samples using lateral flow devices for laboratory diagnostic*. GFRA, Bangkok, (Thaïlande) 29-31 Octobre **2019**.
- 23) Häggglund S., Laloy E., Näslund K., Pfaff F., Eschbaumer M., Romey A., Relmy A., Rikberg A., Svensson, A. , Huet, H., Gorna K., Zühlke D., Riedel , K., Beer M., Zientara S., Bakkali-Kassimi L., Blaise-Boisseau S.

and Valarcher J.F. *Gene signatures associated with foot-and-mouth disease virus infection and persistence part i: persistent FMDV in long-term multilayer cultures of soft palate cells*. EPIZONE, 13ieme congrès, Berlin, 26-28 Août **2019**.

- 24) Romey A, Ullaramu HG, Bulut AN, Jamal S, Belsham G, Hamers C, Hudelet P, Laloy E, Relmy A, Gorna K, Bakkali Kassimi L, Zientara S et Sandra Blaise-Boisseau. *Du terrain au laboratoire de référence : évaluation d'un protocole pour l'envoi à faible coût et sans risque infectieux de prélèvements issus de cas suspects de fièvre aphteuse*. JSDA, ANSES, Maisons-Alfort, (France), 5-6 décembre **2018**.
- 25) Gorna, K., Diop GL., Diop M., Laloy, E., Lo MM., Relmy, A., Romey, A., Seck MT., Ullaramu H.G., Zientara, S., Blaise-Boisseau S. and Bakkali Kassimi L. *Development and evaluation of a multiplex classical rt-pcr for simultaneous detection and typing of fmdv in West Africa*. EUFM 2018 open Session, Borgo Egnazzia, (Italie), 29-31 Octobre **2018**.
- 26) Bakkali Kassimi L, Belsham, G.J., Bulut A.N., Gorna, K., Hamers, C., Hudelet, P., Jamal, S., Laloy, E., Relmy, A., Romey, A., Ullaramu H.G., Zientara, S. and Blaise-Boisseau S. *Rapid, on site, diagnosis of FMD and safe and cost-effective shipment of samples using lateral flow devices for laboratory diagnostic*. 5th EAVLD congress, Bruxelles, (Belgique), 14-17 Octobre **2018**.
- 27) Vandenbogaert, M., Balière, C., Kwasiborski, A., Hourdel, V., Bakkali Kassimi, L., Blaise-Boisseau, S., Batejat, C., Zientara, S., Manuguerra, J.-C and Caro, V. *Third Generation Sequencing Technologies to Decipher Genomic Structures of Recombinant-prone Viruses*. Journées Ouvertes de Biologie Informatique et de Mathématiques (JOBIM), Marseille, (France), 3-6 Juillet **2018**.
- 28) Borde, M., Laloy, E., Richard, Q., Ledey, N., Caignard, G., Relmy, A., Romey, A., Gorna, K., Attoui, H., Vitour, D., Zientara, S., Bakkali Kassimi, L. et Blaise-Boisseau, S. *Validation d'interactions moléculaires candidates entre le virus de la fièvre aphteuse et la cellule-hôte bovine*. XXèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 22-23 Mars **2018**.
- 29) Abdel-aziz A.I., A. Romey, A. Relmy, K. Gorna, E. Laloy, S. Blaise-Boisseau, S. Zientara, R. Lancelot, L. Bakkali Kassimi. *Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus (FMDV) in Chad*. 11th EPIZONE Annual Meeting, Paris, (France), 19-21 Septembre **2017**.
- 30) Blaise-Boisseau S, E.Laloy, S.Hägglund, K.Näslund, S.Bach, G.Caignard, A.Romey, A.Relmy, K.Gorna, C.Kundlacz, D.Vitour, S.Zientara, JF.Valarcher, L.Bakkali-Kassimi. *FMDV- Host interaction in a model of persistently infected bovine cells*. GFRA scientific meeting, Séoul, (Corée du Sud), 25-27 Octobre **2017**.
- 31) Arada Izzedine Abdel-Aziz, Aurore Romey, Anthony Relmy, Kamila Gorna, Eve Laloy, Sandra Blaise-Boisseau, Stephan Zientara, Renaud Lancelot et labib Bakkali Kassimi. *Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse en Afrique Subsaharienne : cas du Tchad*. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, Maisons-Alfort, (France), 25 et 26 octobre **2017**.
- 32) Romey A., Relmy A., Gorna K., Laloy E., Zientara S., Blaise-Boisseau S. et L. Bakkali Kassimi. *Développement d'un protocole pour l'envoi à faible coût et sans risque infectieux de prélèvements de fièvre aphteuse*. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, Maisons-Alfort, (France), 25 et 26 octobre **2017**.
- 33) Relmy A., A. Romey, K. Gorna, Blaise-Boisseau, S, E. Laloy, M. Deodass, K. Samois, H. Rasamoelina, R. Ramjee, A. Jahangeer, E. Cardinale, C. Sailleau, S. Lecollinet, S. Zientara, L. Bakkali Kassimi. *Animal Health crisis in the Indian Ocean: Foot and mouth disease virus in Mauritius and Rodrigues in 2016*. 11th EPIZONE Annual Meeting, Paris, (France), 19-21 Septembre **2017**.
- 34) Romey, A. Relmy, K. Gorna, E. Laloy, S. Zientara, C. Beck, Blaise-Boisseau, S. and L. Bakkali-Kassimi. *The European network for Vesicular Stomatitis diagnosis*. 18th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Sorento, (Italie). 7- 10 juin **2017**.
- 35) Blaise-Boisseau, S., E. Laloy, S. Hägglund, K. Näslund, S. Bach, G. Caignard, A. Romey, A., Relmy, K. Gorna, C. Kundlacz, D. Vitour, S. Zientara, JF. Valarcher, L. Bakkali-Kassimi. *Interactions FMDV-Hôte et persistance dans des modèles de cellules épithéliales bovines*. XIXèmes journées francophones de virologie, Institut Pasteur, Paris (France), 30 et 31 mars **2017**.
- 36) Gorna, K., Relmy, A., Romey, A., Laloy, E., Zientara, S., Blaise-Boisseau, S. and L. Bakkali-Kassimi *Establishment And Validation Of Two Duplex One-Step Real-Time Rt-Pcr Assays For Diagnosis Of Foot-And-Mouth Disease*. Open session EUFMD 2016, Cascais, (Portugal), 26-28 Octobre **2016**.
- 37) Bach S., Caignard G., Kundlacz C., Romey A., Relmy A., Gorna K., Laloy E., Vitour D., Zientara S., Bakkali-

Kassimi L. et S. Blaise-Boisseau. *Caractérisation des Interactions moléculaires virus-hôte au cours de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse*. 6èmes journées d'étude Santé & Société, Maisons-Alfort, (France), 30-31 Mars **2016**.

- 38) Blaise-Boisseau, S., Kopliku L., Relmy A., Romey A., Gorna K., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Etablissement d'un modèle d'infection persistante par le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) en lignée épithéliale bovine*. XVIIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 24-25 Mars **2016**.
- 39) Romey, A., A. Relmy, Gorna, K., S. Zientara, S. Blaise-Boisseau and L. Bakkali-Kassimi. *Use of lateral flow device for safe and low cost shipment of FMDV suspected samples*. 9ième meeting annuel Epizone, Montpellier, (France), 2 et 3 septembre **2015**.
- 40) Kopliku L., Kamila G., Romey A., Stephan Zientara, Labib Bakkali-Kassimi and S. Blaise-Boisseau *Establishment of a persistent FMD virus infection in MDBK cells*. Open Session of the EuFMD, Cavtat, (Croatie), 29-31 Octobre **2014**.
- 41) Relmy A., Gorna K., Romey A., Geolier V., Weber M., Blaise-Boisseau S., Zientara S., and L. Bakkali-Kassimi. *Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Foot-and-Mouth Disease Virus to develop diagnostic assays*. Open Session of the EuFMD, Cavtat, (Croatie), 29-31 Octobre **2014**.
- 42) Romey A., Relmy, R, Gorna, K., Blaise-Boisseau, S., Zientara, S. and L. Bakkali-Kassimi. *Use of lateral flow device for safe and low cost shipment of FMDV suspected samples*. Open Session of the EuFMD, Cavtat, (Croatie), 29-31 Octobre **2014**.
- 43) Romey, A., Lamglait B., Lemberger, K., Relmy A., Gorna, K., Kopliku, L., Blaise-Boisseau S., Zientara, S. and Bakkali – Kassimi, L. *Emergence of Encephalomyocarditis virus in a French Zoo*. 8th Annual EPIZONE Meeting, Copenhagen, (Danemark), 23-25 Septembre **2014**.
- 44) Kopliku L., Gorna K, Relmy A, Romey A, Allemandou A, Zientara S, Blaise-Boisseau S, Bakkali -Kassimi L. *Molecular determinants of foot-and-mouth disease virus persistence*. 5th annual Young Researchers In Life Sciences (YRLS) Conference, Paris, (France), 26-28 Mai **2014**.
- 45) Romey, A. Relmy, A., Gorna, K., Allemandou, A., Blaise-Boisseau, S., Zientara, S., et L. Bakkali Kassimi. 2014. *Evaluation de la spécificité de deux kits ELISA commerciaux pour la détection des anticorps anti-virus de la Fièvre Aphteuse chez des animaux de la faune sauvage*. 6ième Colloque International Francophone De Microbiologie Animale (CIFMIA), Toulouse, (France), 15-16 Mai **2014**.
- 46) Relmy A., Gorna K., Romey A., Geolier V., Weber M., Blaise-Boisseau S., Zientara S., L. Bakkali-Kassimi. *Production et Caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus de la Fièvre Aphteuse*. 6ième Colloque International Francophone De Microbiologie Animale (CIFMIA), Toulouse, (France), 15-16 Mai **2014**.
- 47) Gorna K., Romey A., Relmy A., Allemandou A., **Blaise-Boisseau S.**, Zientara S., L. Bakkali-Kassimi. *Développement et Évaluation d'une RT-PCR en temps réel duplex en une seule étape pour le diagnostic de la Fièvre Aphteuse*. 6ième Colloque International Francophone De Microbiologie Animale (CIFMIA), Toulouse, (France), 15-16 Mai **2014**.
- 48) Relmy A., Gorna K., Romey A., Geolier V., Weber M., Blaise-Boisseau S., Zientara S., L. Bakkali-Kassimi. *Production et Caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus de la Fièvre Aphteuse*. XVIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 6 et 7 Mars **2014**.
- 49) Romey A., Relmy A., Gorna K., Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Zientara S. et Labib Bakkali Kassimi. *Evaluation de la spécificité de deux kits ELISA commerciaux pour la détection des anticorps anti-virus de la Fièvre Aphteuse chez des animaux de la faune sauvage*. XVIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 6 et 7 Mars **2014**.
- 50) Kopliku L., Gorna K, Relmy A, Romey A, Allemandou A, Zientara S, Blaise-Boisseau S et Bakkali -Kassimi L. *Etude des déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse*. XVIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 6 et 7 Mars **2014**.
- 51) Kopliku L., K. Gorna, A. Romey, A. Relmy, A. Allemandou, S. Zientara, Blaise-Boisseau, S. et L. Bakkali-Kassimi. *Study of the molecular determinants of FMDV persistence*. 18th meeting EUROPIE, Blankenberge, (Belgique), 9-14 Mars **2014**.
- 52) Kopliku L., Gorna K., Relmy A., Romey A., Allemandou A., Zientara S., Blaise-Boisseau S., Bakkali -Kassimi

L. *Molecular determinants of foot-and-mouth disease virus persistence*. Epizone, 7th annual meeting, Bruxelles, (Belgique), 1^{er}-4 Octobre **2013**.

- 53) Kopliku L., Gorna K., Relmy A., Romey A., Allemandou A., Zientara S., Blaise-Boisseau S., Bakkali -Kassimi L. *Molecular determinants of foot-and-mouth disease virus persistence*. 5th European Congress of Virology, Lyon, (France). 11-14 Sept **2013**.
- 54) Blaise Boisseau S., Garnier A., Allemandou A., Relmy A., Romey A., Gorna K., Zientara S. and Bakkali-Kassimi L. *Development of a foot-and-mouth disease diagnostic multiplex immunoassay*. 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), Berlin (Allemagne), 5 -8 Juin **2013**.
- 55) Gorna K., Romey A., Relmy A., Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., and L. Bakkali-Kassimi. *Développement et évaluation d'une RT-PCR en temps réel duplex en une seule étape pour le diagnostic de la Fièvre Aphteuse*. XVèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 14-19 avril **2013**.
- 56) Kopliku L., Gorna K., Romey A., Relmy A., Allemandou A., Zientara S., Blaise-Boisseau S. et Bakkali-Kassimi L. 2013. *Etude des déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse (FMDV)*. XVèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 14-19 avril **2013**.
- 57) Blaise-Boisseau S., Garnier A., Allemandou A., Relmy A., Romey A., Gorna K., Zientara S., Bakkali Kassimi L. *Development of a foot-and-mouth disease diagnostic multiplex immunoassay*. Open session EuFMD, Jerez, (Espagne), 29-31 Octobre **2012**.
- 58) Romey A., Relmy A., Gorna K., Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Evaluation of the specificity of two commercial ELISA kits for detection of antibodies against FMDV in wildlife species*. Open session EuFMD, Jerez, (Espagne), 29-31 Octobre **2012**.
- 59) Allemandou A., Romey A., Gorna K., Garnier A., Relmy A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Development of a single test for detection and typing of foot and mouth disease virus and other vesicular disease viruses*. Open session EuFMD, Jerez, (Espagne), 29-31 Octobre **2012**.
- 60) Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Gorna K., Relmy A., Romey A., Zientara S., Bakkali-Kassimi L. *Development of a Luminex-based multiplex assay for molecular detection and typing of FMDV*. Planet XMap meeting, Monaco, (France), 10 et 11 Octobre **2012**.
- 61) Carocci M., Cordonnier N., Huet H., Romey A., Relmy A., Gorna K., Blaise-Boisseau S., Zientara S. and L. Bakkali Kassimi. *Encephalomyocarditis Virus 2A protein is required for viral pathogenesis and inhibition of apoptosis*. Europic 2012, St-Raphaël, (France), 3-7 juin **2012**.
- 62) Gorna K., Romey A., Relmy A., Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Zientara S., L. Bakkali-Kassimi. 2012. *A duplex one-step real time RT-PCR for diagnosis of foot and mouth disease*. Young Researchers In Life Sciences conference (YRLS), Paris, France, 14-16 May **2012**.
- 63) Allemandou A., Blaise-Boisseau S., Gorna K., Relmy A., Romey A., Bakkali-Kassimi L. et Zientara S. 2012. *Développement d'un test multiplex pour la détection et le typage moléculaire du virus de la Fièvre Aphteuse*. XIVèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, (France), 29 et 30 Mars **2012**.
- 64) Gorna K., Relmy A., Romey A., Carocci M., Blaise-Boisseau S., Zientara S., L. Bakkali-Kassimi. *Diagnostic de la Fièvre Aphteuse au Laboratoire National de Référence en France: méthodes actuelles et perspectives de développement*. XIIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 28-29 avril **2011**.
- 65) Blaise-Boisseau, S., Guy, M., Zientara, S. and L. Bakkali-Kassimi. *Development of a Foot-and- Mouth Virus Disease diagnostic multiplex immunoassay*. 1er Congrès EAVLD, Lelystad, (Pays Bas), 15-17 Septembre **2010**.
- 66) Blaise-Boisseau, S., Guy, M., Zientara, S. and L. Bakkali-Kassimi. « Development of a Foot-and- Mouth Virus Disease diagnostic multiplex immunoassay. 4ième Congrès Epizone, Saint-malo, (France), 7-10 Juin **2010**.
- 67) Blaise-Boisseau, S., Guy, M., Zientara, S. and L. Bakkali-Kassimi. *Développement d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse*. XIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 18 et 19 mars **2010**.
- 68) Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., et Perelle S. *Développement d'un contrôle interne pour la détection du virus de l'hépatite A dans les aliments*. XIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut

Pasteur, Paris, 23 et 24 Avril **2009**.

- 69) Pinon, A., Deboosere, N., Delobel, A., Merle, G., Blaise-Boisseau, S., Perelle, S., Temmam, S., Morin, T., Vialette, M. *Modélisation de la thermorésistance de virus de l'Hépatite A dans des purées de fruits rouges acides*. XIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 23 et 24 Avril **2009**.
- 70) Temmam, S., Merle, G., Blaise-Boisseau, S., Deboosere, N., Pinon, A., Morin, T., Perelle, S. *Evaluation de l'effet synergique du couple acidification / chauffage thermique sur l'inactivation du Virus de l'Hépatite A inoculé expérimentalement dans des purées de framboises*. XIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 23 et 24 Avril **2009**.
- 71) Temmam, S., Burger, C., Blaise-Boisseau, S., Morin T., Perelle, S. *Evaluation de l'efficacité virucide de l'hypochlorite de sodium et d'un composé oxydant non halogéné à base d'acide péracétique sur le Virus de l'Hépatite A et le Calicivirus Félin présents à la surface de laitues inoculées expérimentalement*. XIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 23 et 24 Avril **2009**.
- 72) Blaise, S., Mangeney, M. and Heidmann, T. *Rôle potentiel des protéines d'enveloppes rétrovirales dans la progression tumorale*. Journées de la recherche de l'Institut Gustave Roussy, Saint-Malo, (France), juin **2001**

PARTIE I : SYNTHÈSE DE MES TRAVAUX DE RECHERCHE

L'ensemble de mes travaux de recherche depuis mon DEA en 1999 ont été réalisés dans le domaine de la virologie, des rétrovirus endogènes puis exogènes pour ensuite travailler sur les virus entériques et à présent de puis 2009 me consacrer au virus de la fièvre aphteuse.

TRAVAUX DOCTORAUX ET POST-DOCTORAUX

Entre 1999 et 2004, j'ai réalisé mes travaux de Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) puis de thèse au sein de l'unité mixte de recherche (UMR) CNRS 8122 (dirigée par le Dr Thierry Heidmann) à L'Institut Gustave Roussy, à Villejuif sous la direction du Dr Thierry Heidmann. Pour réaliser ces travaux j'ai bénéficié d'une allocation du ministère de la recherche technologique (allocation de thèse MRT) pendant 3 ans et d'une bourse de fin de thèse de la Ligue contre le cancer pour 12 mois supplémentaires.

De Janvier à Aout 2005, j'ai réalisé mes travaux post-doctoraux à l'Institut Pasteur (Paris) au sein de l'unité « régulations des infections rétrovirales » dirigée par Mme le Pr. Françoise Barré-Sinoussi et sous la responsabilité du Dr Elisabeth Menu. Ce contrat post-doctoral a été financé par l'Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) suite à un dépôt de projet en septembre 2004 que j'avais écrit avec l'aide et le soutien de l'équipe d'accueil.

Mes travaux doctoraux et postdoctoraux se sont inscrits dans le domaine de la rétrovirologie et déjà dans la problématique des interactions virus/hôtes. Je me suis plus particulièrement intéressée aux propriétés des protéines d'enveloppe rétrovirales avec l'étude du potentiel immunosuppresseur de la protéine d'enveloppe du virus MPMV (Mason-Pfizer Monkey Virus) pendant mon DEA. Mon travail de doctorat a ensuite porté sur la caractérisation fonctionnelle de protéines d'enveloppe de rétrovirus endogènes humains. J'ai ensuite initié un contrat post-doctoral portant sur le rétrovirus infectieux humain VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), découvert il y a 40 ans et malheureusement toujours d'actualité avec 39 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2022 dont 1,3 million de personnes infectées en 2022 (*source : <https://www.unaids.org>*).

1. Analyse *in vivo* du potentiel immunosuppresseur de protéines d'enveloppe rétrovirales

Les infections virales (par le virus de la rougeole, le virus EBV, le VIH-1...) s'accompagnent fréquemment de dysfonctionnements de la réponse immunitaire chez l'organisme-hôte infecté, ce qui pourrait permettre au virus de coloniser plus efficacement l'organisme. Un certain nombre de travaux réalisés sur des animaux infectés ou utilisant des rétrovirus inactivés ont en effet suggéré que les rétrovirus, notamment FeLV ("Feline Leukemia Virus") et MoMLV ("Moloney Murine Leukemia Virus"), possèdent des propriétés immunosuppressives. Des expériences complémentaires menées *in vitro* ont permis d'associer cette activité immunosuppressive à la sous-unité transmembranaire (TM) des protéines d'enveloppe des rétrovirus de type C, FeLV et MoMLV et plus précisément à une séquence peptidique appelée "séquence immunosuppressive", très conservée au sein des protéines d'enveloppe rétrovirales (**Figure 1 et Figure 2**).

D'autre part, au laboratoire dirigé par Thierry Heidmann, un test réalisé chez la souris avait préalablement permis d'analyser l'activité immunosuppressive *in vivo* de la protéine d'enveloppe du rétrovirus MoMLV. Le principe de ce test reposait sur la capacité de molécules immunosuppressives à inhiber la réponse immunitaire de l'hôte contre des cellules tumorales allogéniques greffées. Cette immunosuppression locale peut-être quantifiée en mesurant le volume des tumeurs obtenues, ainsi que leur cinétique d'apparition. Parallèlement, ce test a également été développé dans le contexte d'une réponse syngénique, en utilisant des cellules tumorales exprimant des antigènes de rejet. Ces deux modèles ont permis de montrer que la protéine d'enveloppe du rétrovirus MoMLV et plus précisément sa sous-unité transmembranaire, a des propriétés immunosuppressives *in vivo* (1).

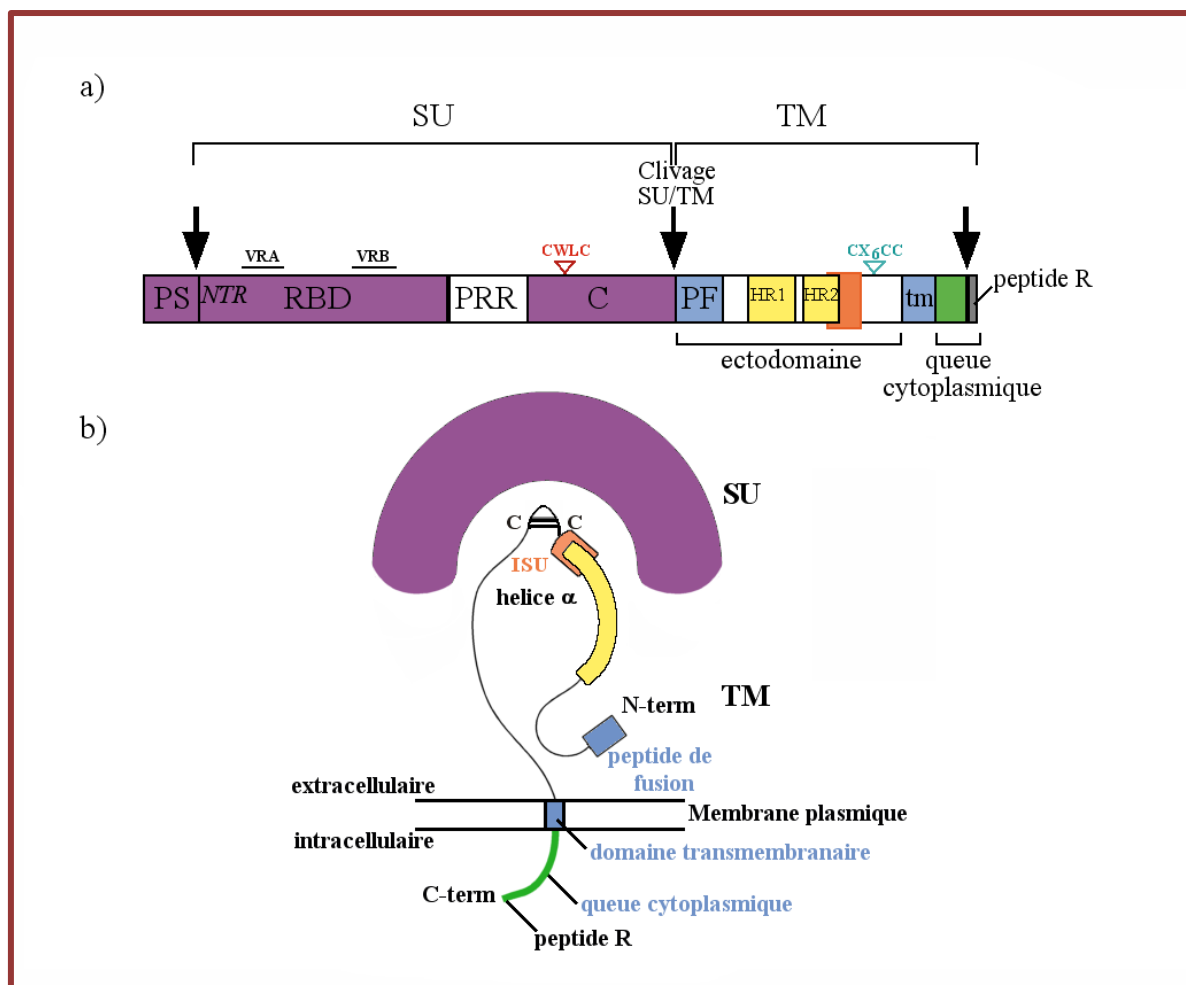


Figure 1 : Structure schématique des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales a) localisation des domaines et motifs structuraux dans le précurseur d'une glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus de type C. Les flèches indiquent les différents sites de clivage, de gauche à droite : site de clivage du peptide signal (PS), SU/TM (sous-unité de Surface/domaine TransMembranaire et du peptide R. RBD : « receptor binding domain », domaine de liaison au récepteur ; VRA et VRB, 2 régions hypervariables ; PRR : « proline rich region » qui relie RBD et domaine C terminal de la SU ; C : domaine C terminal de la SU avec CWLC : motif impliqué dans la formation d'un pont disulfure labile entre SU et TM ; PF : peptide de fusion ; HR1 et HR2 : motifs "heptad repeat" structurés en hélice alpha. Ces motifs sont impliqués dans l'oligomérisation des protéines d'enveloppe ; CX6CC, motif dont les résidus cystéine forment un pont disulfure intramoléculaire ; TM : domaine transmembranaire ; b) Structure schématique d'un hétérodimère SU/TM et domaines conservés dans la sous-unité TM de nombreux rétrovirus. ISU : domaine immunosuppresseur de 17 acides aminés (d'après (Benit et coll., 2001) (2)), **Figure extraite du manuscrit de thèse de Sandra Blaise, 2004.**

MoMLV (CKS17)	LQNRRGLDLLFLKEGGL
FeLV	LQNRRGLDLFIQEGGL
RSV	LQNRAAIDFLLAHGHG
HTLV-1	AQNRRGLDLLWEQGGI
MPMV	LQNRRGLDLTAEQGGI

Figure 2 : Séquence du domaine immunosuppresseur de différents rétrovirus.

Figure extraite du manuscrit de thèse de Sandra Blaise, 2004.

Mes travaux de DEA se sont inscrits dans la suite directe de ces résultats. Nous avons ainsi entrepris d'analyser le potentiel immunosuppresseur de la protéine d'enveloppe d'un autre rétrovirus, le virus MPMV ("Mason-Pfizer Monkey Virus"), prototype des rétrovirus de type D. Après avoir établi des lignées de cellules tumorales exprimant de manière stable la protéine d'enveloppe du virus MPMV, j'ai procédé au test d'immunosuppression *in vivo* en modèle murin précédemment décrit, en contexte allogénique ou syngénique. En parallèle de cette étude, j'ai également construit des vecteurs d'expression eucaryote, destinés à permettre une cartographie fonctionnelle de la séquence immunosuppressive de la protéine d'enveloppe du virus murin MoMLV. J'ai ainsi pu démontrer le potentiel immunosuppresseur *in vivo* de la protéine d'enveloppe du virus simien MPMV. Ces résultats démontrent que l'activité immunosuppressive portée par la protéine d'enveloppe

du virus de type C, MoMLV n'est pas restreinte à ce seul rétrovirus murin mais est partagée par un autre rétrovirus, en l'occurrence le virus MPMV, rétrovirus de primate et de type D. Ceci suggère une conservation fonctionnelle de la séquence immunosuppressive en plus de sa conservation en séquence. Ces résultats posaient également la question du potentiel immunosuppresseur des protéines d'enveloppe des rétrovirus endogènes humains, pour peu qu'elles soient exprimées...

2. Caractérisation fonctionnelle d'une protéine d'enveloppe endogène rétrovirale de la famille HERV-FRD, conservation au cours de l'évolution et signification biologique potentielle

Les premiers rétrovirus endogènes furent caractérisés au début des années 1970 chez le poulet et la souris, en parallèle de la découverte de la transcriptase inverse. Le fait que certains de ces rétrovirus soient compétents pour la réplication et associés parfois à des pathologies tumorales a motivé la recherche de tels provirus chez l'homme.

Près de la moitié du génome humain est composé d'éléments transposables et notamment de 8 % de séquences d'origine rétrovirale ou rétrovirus endogènes humains (HERV, "Human Endogenous RetroViruses") (3). Les HERV ont la même structure interne que les rétrovirus exogènes (**Figure 3**).

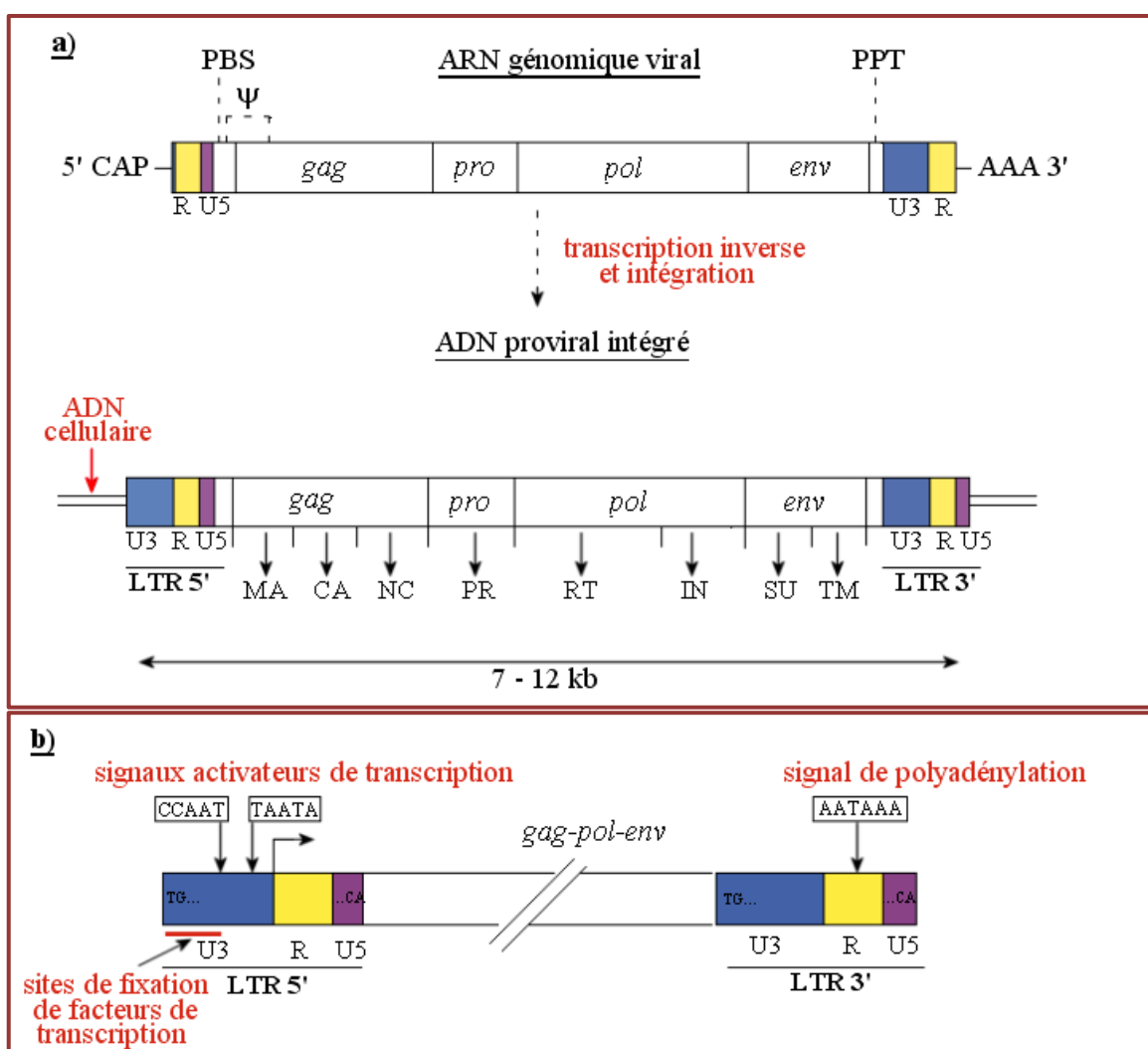


Figure 3 : Structure et organisation génétique des formes génomique et provirale des rétrovirus.

a) L'ARN génomique rétroviral est une molécule simple brin de polarité positive. Une molécule d'ARN de transfert cellulaire se fixe sur la séquence PBS ("primer binding site") pour initier la transcription inverse. Les autres séquences importantes pour la réplication sont indiquées: PPT ("PolyPurine Tract"); Ψ ("psi", signal d'encapsidation). La forme provirale intégrée est une molécule d'ADN double brin. Elle présente au minimum quatre gènes structuraux : *gag*, *pro*, *pol* et *env* (cas des rétrovirus simples) mais certains rétrovirus dits complexes comportent un ou plusieurs gènes additionnels dans leur génome, à différentes positions possibles. La forme provirale est encadrée par des LTR composés de trois régions: U3, R et U5. b) Séquences promotrices et régulatrices présentes dans les LTR des rétrovirus. **Figure extraite du manuscrit de thèse de Sandra Blaise, 2004.**

La plupart des HERV sont dégénérés, soit en raison de la recombinaison entre les deux LTR (Long Terminal Repeat) du provirus, soit en raison de mutations interrompant les ORF (Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture) rétroviraux. Ils représentent l'héritage d'anciennes infections de cellules germinales par des rétrovirus exogènes et la transmission ultérieure des provirus intégrés aux descendants (**Figure 4**). Bien qu'aucun HERV compatible avec la réplication n'ait été mis en évidence, certains conservent jusqu'à trois ou quatre ORF intacts.

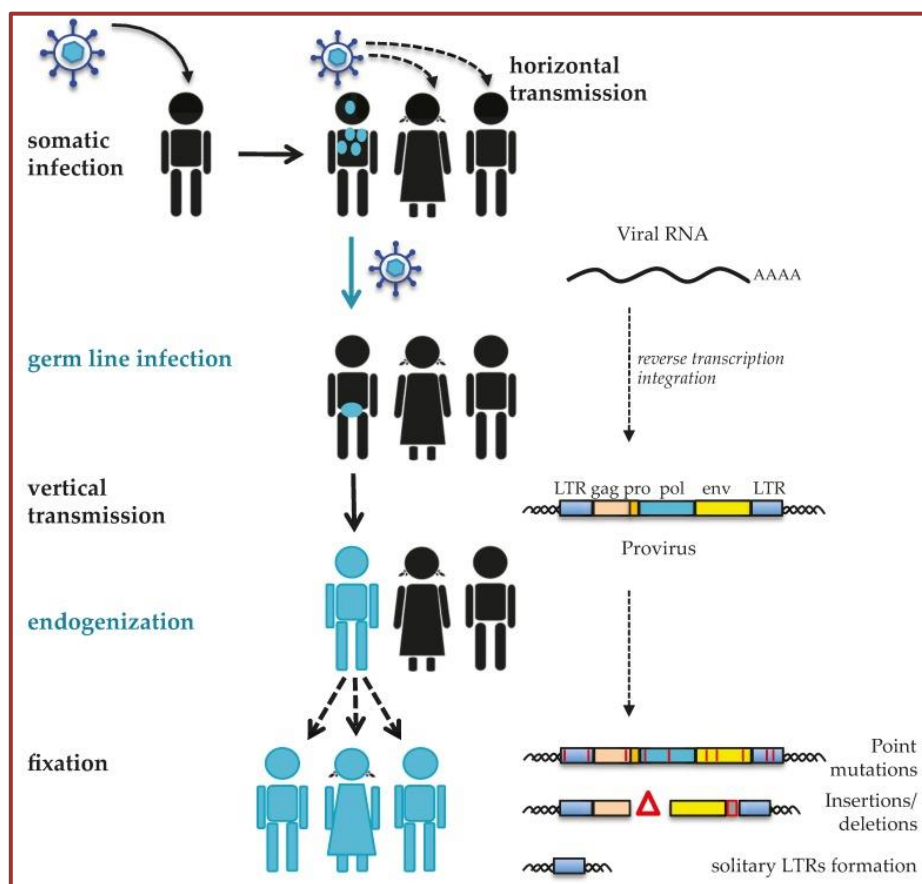


Figure 4 : Endogénisation des rétrovirus et formation des rétrovirus endogènes humains (HERV)

Au cours de la réplication, l'ARN rétroviral est rétrotranscrit en un provirus à ADN double brin (ADNdb) et intégré dans le génome cellulaire. Tous les rétrovirus humains actuels ciblent les cellules somatiques, montrant une transmission horizontale d'un individu infecté (humain ou ancêtre primate) à de nouveaux hôtes. Les rétrovirus exogènes qui ont donné naissance aux HERV étaient également capables d'infecter les cellules de la lignée germinale. Ainsi, les séquences HERV intégrées ont été héritées de manière mendélienne, transmises verticalement par la descendance et fixées dans le génome humain. Au cours de l'évolution, la majorité des HERV ont accumulé des mutations qui ont généralement compromis leur capacité de codage. Dans plusieurs cas, la recombinaison homologue de la longue répétition terminale (LTR) - LTR a conduit à l'élimination de toute la partie interne, ne laissant qu'une LTR solitaire comme relique. *D'après Grandi & Tramontano 2017, (4)*

Le sujet de mon travail de thèse, sous la direction du Dr Thierry Heidmann, s'est inscrit dans le contexte de la recherche systématique, parmi les milliers de séquences HERV présentes dans le génome humain, de gènes d'enveloppe totalement codants. Ce travail mené au sein du laboratoire a conduit à l'identification de 16 gènes d'enveloppe rétrovirale endogènes entièrement codants (**5**). Le but de ce travail de thèse était tout d'abord de cloner les différents gènes d'enveloppe dans des vecteurs d'expression adéquats pour permettre leur caractérisation fonctionnelle. Cette étude s'est fondée pour l'essentiel sur les propriétés tout à fait intéressantes des protéines d'enveloppe des rétrovirus infectieux ainsi que sur les premières données concernant les fonctionnalités de la protéine d'enveloppe EnvW ou *syncytine-1*.

J'ai ainsi entrepris l'étude du pouvoir infectieux de chacune des 16 protéines d'enveloppe dans un large panel de lignées cellulaires de mammifères (homme, singe, souris, chat, chien) à l'aide de pseudo-particules virales. Ce criblage des protéines d'enveloppe endogènes pour la fonction de fusion cellule-cellule et d'infection (fusion virus-cellule) nous a permis de mettre en évidence un gène codant pour une protéine d'enveloppe rétrovirale endogène fonctionnelle jamais caractérisée auparavant (HERV-FRD ou *syncytine-2* comme nommée à présent), **Figure 5**. J'ai poursuivi l'étude extensive du gène codant pour cette protéine, à savoir, sa conservation au cours de l'évolution et son polymorphisme, et travaillé sur la signification biologique potentielle associée à la présence et la persistance de ce gène d'origine rétrovirale dans notre génome.

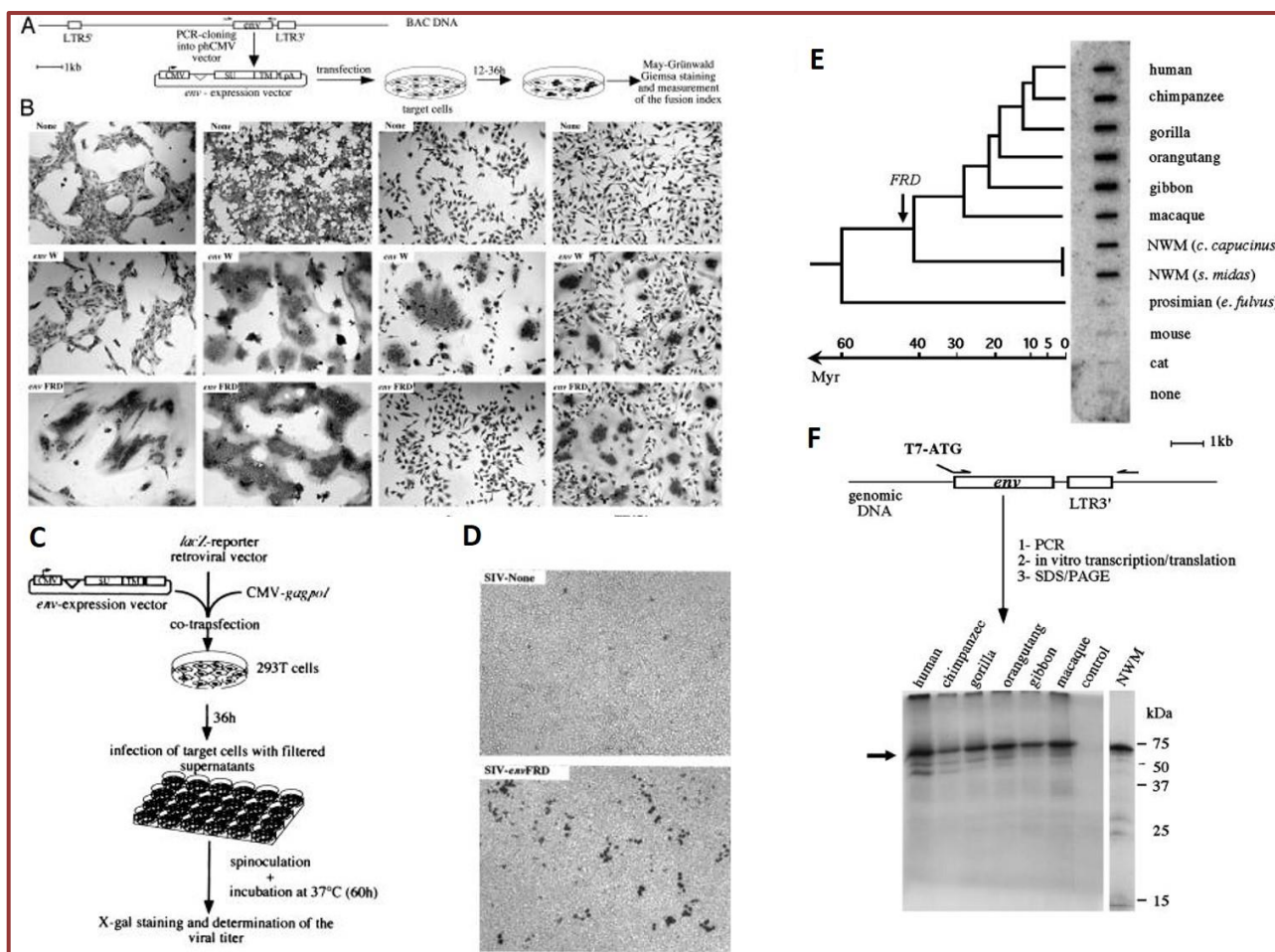


Figure 5 : Conservation fonctionnelle de la protéine d'enveloppe HERV-FRD

Fusion cellule-cellule médiée par l'enveloppe. (A) Construction de vecteurs exprimant l'enveloppe et test de fusion. Chacun des 16 gènes d'enveloppe a été amplifié par PCR à partir de l'ADN BAC et cloné dans le vecteur d'expression phCMV. Les gènes *env* insérés entre l'intron de la β -globine et les séquences pA sont schématisés avec le site de clivage putatif entre les sous-domaines SU et TM de l'enveloppe. Les cellules ont été transfectées avec les vecteurs exprimant l'*env* et colorées avec les solutions May-Grünwald et Giemsa 12 h (pour les cellules G355-5) ou 36 h (pour les autres types de cellules) après la transfection. Les indices de fusion ont ensuite été calculés. (B) Formation de syncytia par les glycoprotéines d'enveloppe HERV dans différents types de cellules. Les cellules ont été transfectées avec des vecteurs exprimant l'enveloppe HERV-FRD (*env*FRD), l'enveloppe HERV-W (*env*W) ou un vecteur vide (*None*).

Essais d'infection utilisant des particules rétrovirales pseudotypées avec les enveloppes HERV-FRD humaines ou simiennes ou contrôle. (C) Pour déterminer si l'enveloppe HERV-FRD pouvait conférer une infectivité aux pseudoparticules défectueuses MLV, VIH ou SIV, des virus pseudotypés correspondants ont été produits en cotransfectant des cellules 293T avec un vecteur phCMV-HERV-FRD, un vecteur codant pour les protéines rétrovirales (à l'exception de l'enveloppe) du MLV, du VIH ou du SIV; et les vecteurs rétroviraux défectueux correspondants marqués d'un gène rapporteur de la β -galactosidase. 36 h post-transfection, les surnageants viraux ont été recueillis et filtrés à travers des membranes de 0,45- μ m de taille de pores pour inoculer des cellules cibles (murines 3T3; félins G355-5; ou humaines TE671, HeLa et 293T) en présence de polybrène et avec une étape de spinoculation. Après élimination des surnageants, les cellules ont été incubées dans du milieu ordinaire pendant 60 h à 37°C. Les titres viraux ont ensuite été mesurés par coloration au X-Gal. Les titres viraux ont ensuite été mesurés par coloration des cellules au X-Gal et exprimés en UFC lacZ par millilitre de surnageant viral. (D) Infectivité des particules rétrovirales SIV pseudotypées avec l'enveloppe HERV-FRD, évaluée sur cellules humaines 293T.

Conservation du locus env et de l'ORF de HERV-FRD dans l'évolution des primates. (E) Slot-blot d'ADN génomique provenant d'espèces simiennes, prosimiennes, de chats et de souris, sondés avec un fragment *env* de HERV-FRD. La date d'insertion présumée de HERV-FRD est indiquée par une flèche sur l'arbre phylogénétique des primates à gauche. NWM, singe du Nouveau Monde. (F) Essai de transcription/traduction in vitro du gène *env* de l'HERV-FRD humain et des gènes orthologues des espèces simiennes indiquées. Les gènes *env* ont été amplifiés par PCR comme indiqué sur le schéma, soumis à une transcription/traduction in vitro ("contrôle" sans matrice d'ADN), analysés sur un gel de polyacrylamide et autoradiographiés. La flèche indique les bandes de taille attendue. **Figure adaptée de Blaise et al, 2003 et Blaise et al, 2004**

En collaboration avec l'équipe du Dr Cosset à Lyon et du Pr Evain-Brion à Paris, j'ai pu rassembler un certain nombre d'arguments en faveur du rôle de ce gène dans la physiologie placentaire humaine (**Figure 6 et Figure 7**), avec notamment l'expression de cette protéine d'enveloppe limitée aux cellules cytotrophoblastiques villositaires (**6**). Par ailleurs nous avons pu montrer que l'expression de la syncytine-2 met en évidence la différenciation anormale du trophoblaste observée dans le placenta des grossesses affectées par la trisomie 21 (**7**).

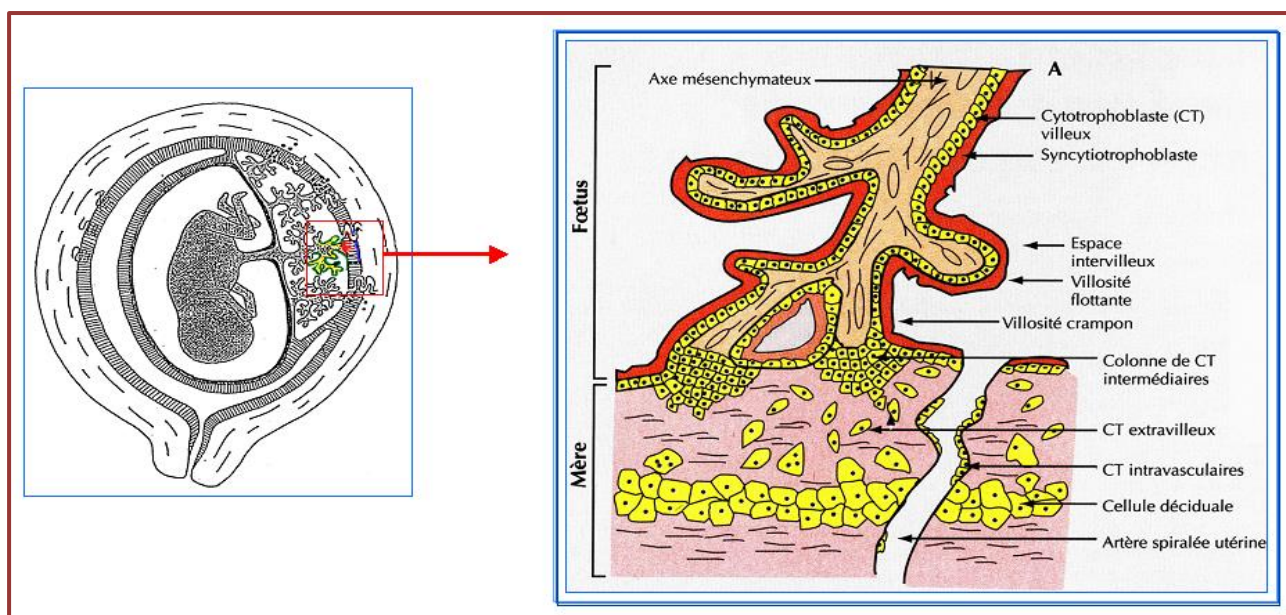


Figure 6 : Détail d'une villosité chorionale, unité structurale et fonctionnelle du placenta humain. Chez l'homme, à 10-12 semaines de grossesse, les villosités flottantes chorioniques sont en contact avec le sang maternel dans l'espace sanguin maternel (ESM). Dans ces villosités, les cellules cytotrophoblastiques (CT) se différencient par fusion pour générer le syncytiotrophoblaste (ST). Dans les villosités d'ancrage, les cellules cytotrophoblastiques prolifèrent et envahissent la caduque. Les cellules cytotrophoblastiques extravillositaires (ECT) envahissent la lumière des artères utérines. *Figure extraite du manuscrit de thèse de Sandra Blaise, 2004.*

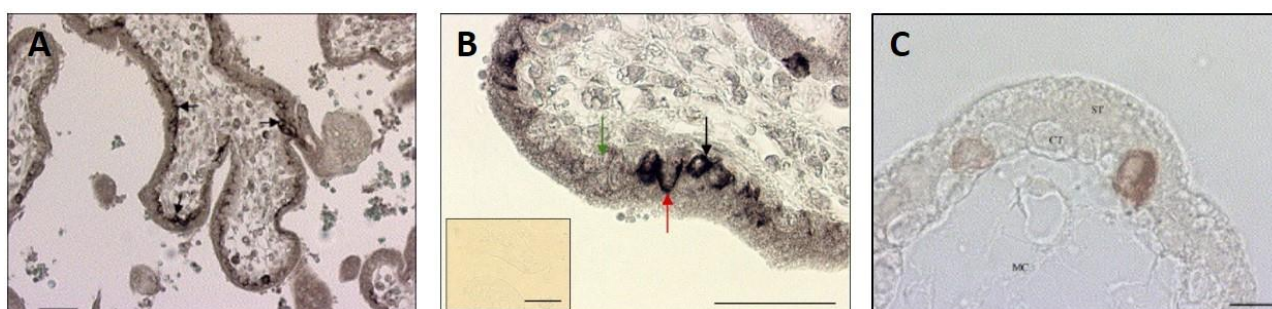


Figure 7 : L'expression de la glycoprotéine fusogène HERV-FRD Env (syncytine-2) dans le placenta humain est limitée aux cellules cytotrophoblastiques villositaires. (A) Analyse immunohistochimique de la syncytine 2 (HERV-FRD Env) dans le trophoblaste villositaire des villosités flottantes du placenta (16 semaines de gestation). L'immunomarquage avec l'anticorps monoclonal anti-syncytine 2 montre une réactivité positive dans les cellules cytotrophoblastiques (flèches noires), non uniformément distribuée le long de la couche de cellules cytotrophoblastiques. Aucun marquage ne peut être détecté au niveau du syncytiotrophoblaste ou du noyau mésenchymateux des villosités. Barre d'échelle $\frac{1}{4}$ 50 mm. (B) Analyse immunohistochimique de la syncytine 2 dans le trophoblaste villositaire (12 semaines). L'immunomarquage a été observé dans le cytoplasme des cellules cytotrophoblastiques (flèche noire) et au niveau de la membrane, à l'interface entre les cellules cytotrophoblastiques et le syncytiotrophoblaste (flèche rouge). Certaines cellules cytotrophoblastiques n'ont pas été immunocolorées (flèche verte). Aucune réactivité n'a été observée sur les coupes contrôle incubées avec un anticorps IgG1 non spécifique (encart). Barre d'échelle $\frac{1}{4}$ 40 mm. (C) Analyse immunohistochimique de la syncytine 2 dans le trophoblaste villositaire des villosités flottantes du placenta du premier trimestre (8 semaines de gestation). Ce fort grossissement permet d'établir clairement la localisation cytoplasmique dans les cellules cytotrophoblastiques (CT). Aucun immunomarquage n'a été observé dans le syncytiotrophoblaste (ST) et dans le noyau mésenchymateux (MC). Barre d'échelle $\frac{1}{4}$ 10 mm. *Figure adaptée de Malassiné et al, 2007*

Depuis ces premiers travaux ayant identifié une « syncytine-2 » d'origine rétrovirale chez l'homme, des gènes « syncytines » ont été retrouvés chez tous les mammifères placentaires où ils ont été recherchés, y compris les marsupiaux. Il est remarquable de constater que la capture de gènes syncytine ou de gènes semblables à la syncytine, parfois par paires, s'est produite indépendamment de différents rétrovirus endogènes dans diverses lignées de mammifères telles que les primates - y compris les humains -, les muroides, les léporidés, les carnivores, les cavidés et les ovis, il y a environ 10 à 85 millions d'années. L'inactivation d'un ou des deux gènes syncytine-A et -B de la souris a prouvé qu'ils jouaient un rôle essentiel dans la placentation. La question du rôle du domaine immunosuppresseur intégré dans les glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales et conservé dans les protéines syncytines, dans la tolérance du fœtus par le système immunitaire maternel reste par ailleurs ouverte, avec des propriétés immunosuppressives « découplées » des propriétés fusogènes permettant la formation du ST (8). Plus récemment, en utilisant des cultures de trophoblastes humains ou de souris, l'équipe des Dr T. Heidmann et A. Dupressoir, en collaboration avec O. Schwartz, ont pu montrer que les protéines

transmembranaires induites par l'IFN (IFITM), une famille de facteurs de restriction bloquant l'étape d'entrée de nombreux virus, entravent la formation des ST et inhibent la fusion médiée par la syncytine (9). Durant mon doctorat, j'ai par ailleurs co-encadré successivement un élève en école d'ingénieur, un étudiant en licence du magistère de l'ENS ULM et un étudiant en DEA. Après la soutenance de ma thèse en octobre 2004, et avant de commencer mon premier contrat post-doctoral, j'ai entrepris la caractérisation fonctionnelle de deux nouveaux gènes endogènes d'origine rétrovirale codant chacun pour une protéine d'enveloppe, très récemment identifiés et s'ajoutant ainsi à la liste des 16 gènes initialement établie dans notre laboratoire. L'un des deux gènes, envP(b) est exprimé dans divers tissus humains et code pour une protéine fusogène. L'autre gène, envV, exprimé spécifiquement dans le placenta humain, code pour une protéine révélée non fusogène au terme d'un test de fusion réalisé dans un large panel de type cellulaires (10).

3. Etude des mécanismes impliqués dans le contrôle du VIH-1 dans des cellules trophoblastiques humaines naturellement résistantes à l'infection

En janvier 2005, j'ai commencé mon stage post-doctoral dans l'unité « régulations des infections rétrovirales » dirigée par Mme le Pr. Françoise Barré-Sinoussi à l'Institut Pasteur, co-découvreuse du VIH en 1983. J'ai précisément travaillé dans le groupe « TME » dirigé alors par Elisabeth Menu et dédié à la compréhension des mécanismes de transmission du VIH de la mère à l'enfant. Le VIH peut en effet se transmettre de la mère à l'enfant pendant la grossesse, lors de l'accouchement mais également par l'allaitement (11), **Figure 8**.

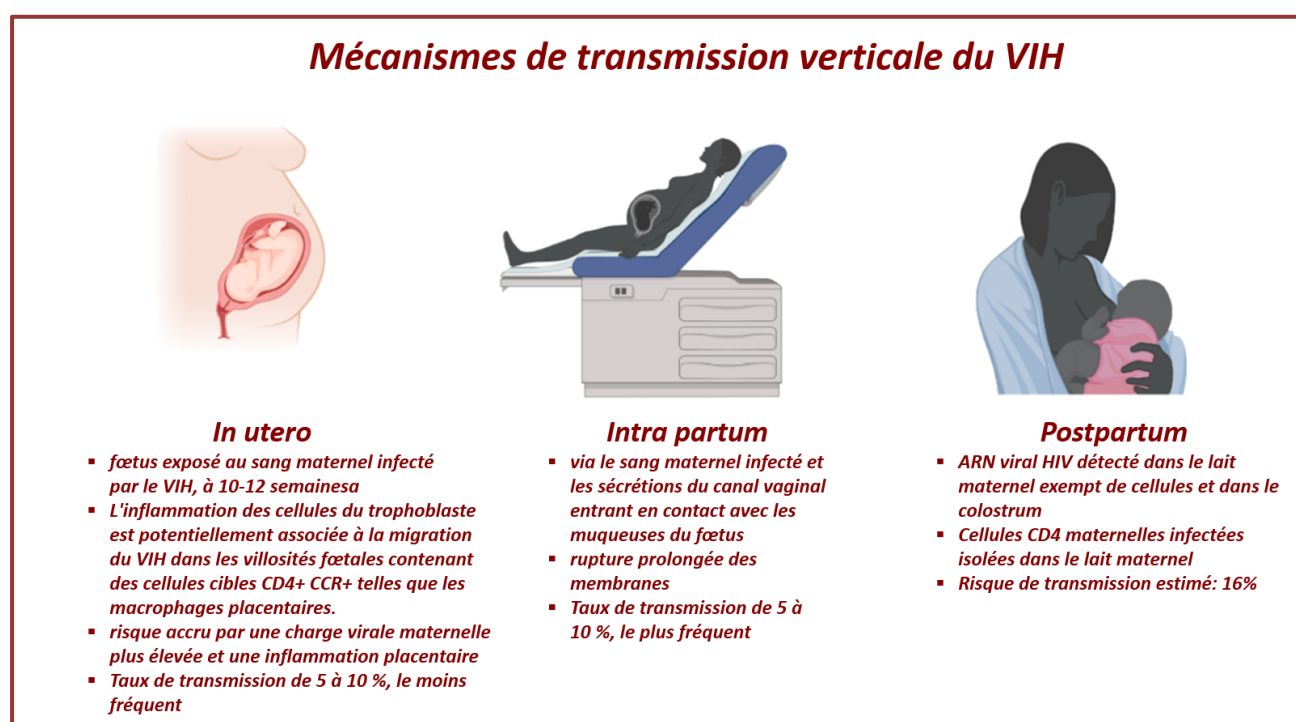


Figure 8 : Mécanismes de transmission verticale du VIH *Adapté de Cardenas, 2023* (11)

La transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant (TME) reste un problème de santé mondial important malgré la mise en œuvre d'une thérapie antirétrovirale combinée pour le traitement maternel ainsi que pour prévenir la transmission à l'enfant. Le risque de transmission in utero du VIH-1 en l'absence d'interventions est de ~7%. Ce faible taux de transmission indique que des mécanismes innés et adaptatifs limitent l'infection lentivirale dans le placenta (12,13), **Figure 9**.

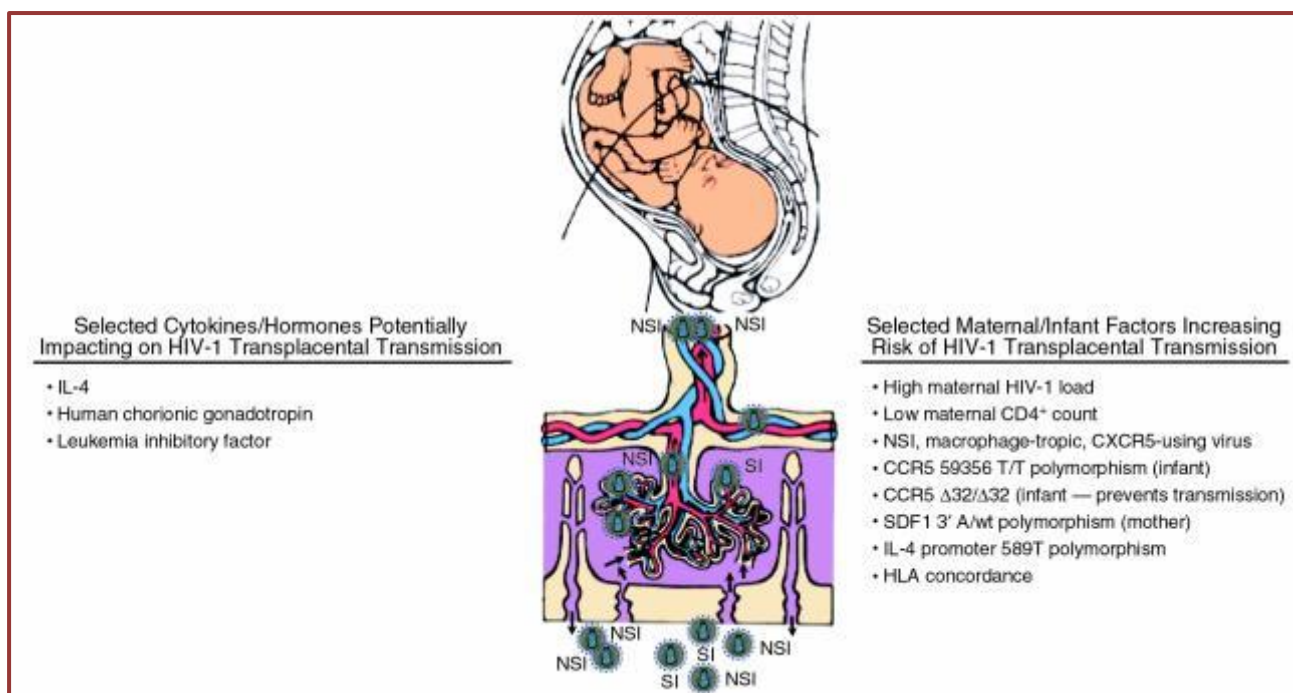


Figure 9 : Transmission du VIH-1 de la mère au nourrisson in utero De plus en plus d'éléments indiquent que la transmission transplacentaire du VIH-1 est le résultat d'une interaction complexe entre les facteurs génétiques du virus, de la mère et de l'enfant. Une charge virale maternelle élevée et un faible nombre de lymphocytes CD4⁺ sont le plus souvent associés à une transmission par un virus utilisant le CXCR4 (inducteur de syncytium [SI], T-tropique) chez la mère. Les facteurs génétiques de la mère et de l'enfant sont également des déterminants importants de la transmission. Les polymorphismes des gènes codant pour le récepteur de chimiokine CCR5 chez le nourrisson peuvent diminuer le risque de transmission. De même, les polymorphismes dans les gènes codant pour les cytokines et les hormones telles que LIF, hCG et IL-4 contribuent probablement à la barrière placentaire contre la transmission virale. *Adapté de Spector, 2001 (13)*

Mon projet de recherche, financé par l'ANRS en 2005, avait pour objectif l'étude des mécanismes impliqués dans le contrôle du VIH-1 dans des cellules trophoblastiques humaines naturellement résistantes à l'infection par des virions libres VIH-1. Les cellules trophoblastiques qui composent les couches externes des villosités chorioniques du placenta humain et qui sont en contact direct avec le sang maternel tout au long de la grossesse jouent en effet un rôle crucial de barrière naturelle contre la transmission in utero du virus de la mère à l'enfant. Les données de la littérature, ainsi que les travaux de l'équipe d'accueil avaient montré que le contact avec des cellules infectées aboutit à un passage et à une sélection de variants viraux à travers la barrière trophoblastique. Par contre les cellules trophoblastiques ou des lignées cellulaires dérivées de cellules trophoblastiques (les lignées de choriocarcinomes) se révélaient non permissives à l'infection par du virus libre. En effet, bien que le virus rentrait dans ces cellules, il n'y avait pas d'infection productive. L'ensemble de ces résultats indiquait une restriction de l'infection par le VIH, dans les cellules trophoblastiques, même en présence des récepteurs CXCR4, CCR5 et CD4⁺, dans les étapes précoces du cycle viral, avant l'intégration (14). Les mécanismes de cette restriction responsables de la résistance naturelle de ces cellules humaines à l'infection par le VIH-1 et les facteurs impliqués restaient à identifier.

Plus précisément, mon objectif était de déterminer l'étape (ou les étapes) du cycle rétroviral à laquelle intervient la restriction de l'infection par le VIH-1 et sa spécificité (restriction uniquement au VIH ou au SIV ?), mais également de caractériser les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène. Durant les 8 mois passés à travailler sur ce sujet, j'ai mis au point un certain nombre d'outils et notamment produit des lots de pseudoparticules virales VIH-1 de tropisme différent (CXCR4 ou CCR5) qui ont également été utilisés dans un autre projet valorisé par une publication dont je suis co-auteur. Mes activités de recherche post-doctorale m'ont permis de plus d'acquérir une expérience dans la manipulation de souches virales VIH-1 pathogènes pour l'homme (ex : production, amplification et titrage de souches de virus VIH-1) dans des locaux appropriés de niveau de protection et de confinement P3.

En parallèle de mon projet principal, j'avais initié un projet de recherche sur les cellules de la décidua maternelle. La décidua est la muqueuse de la paroi utérine sur laquelle le placenta est ancré. Très riche en cellules immunitaires maternelles, la décidua constitue, avec le placenta, un site immunitaire privilégié, nécessaire à la tolérance du fœtus semi-allogénique ainsi qu'à la protection contre la transmission d'agents pathogènes. Les objectifs de ce projet étaient (i) isoler les cellules de la décidua et étudier la capacité de virus

VIH-1 X4 ou R5 à les infecter in vitro (ii) isoler les cellules de la décidua de femmes positives au VIH-1 et déterminer le statut infectieux de ces cellules (génomme proviral, infection productive ?). Pour pouvoir mettre en œuvre ce projet, je suis allée me former 2 semaines en Croatie aux techniques d'isolement de cellules de la décidua humaine, à l'université de Rijeka, dans le laboratoire du Pr Daniel Rukavina en avril 2005.

Mon expérience doctorale et le début de mon post-doctorat m'ont permis de concourir fin avril 2005 pour un poste de chargée de recherches en virologie ouvert par l'AFSSA et d'être sélectionnée. J'ai alors interrompu mon contrat au bout de 8 mois.

Projet de DEA	Travaux publiés dans <i>Journal of General Virology</i> (33)
Projet doctoral	Travaux publiés dans <i>PNAS</i> (32), <i>Journal of Virology</i> (31, 28), <i>Retrovirology</i> (30, 25), <i>BMC genomics</i> (29) et dans <i>Placenta</i> (26)
Projet post-doctoral	Travaux publiés dans <i>Retrovirology</i> (27)

NB : En 2020, Tang et collaborateurs ont publié leurs recherches montrant que la syncytine-1, la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus endogène humain de la famille W1, facilite l'infection par le VIH dans les trophoblastes par fusion cellulaire. Ce mécanisme d'entrée du VIH aide le virus à franchir la barrière placentaire pour infecter les tissus profonds. La syncytine peut faciliter la dissémination du VIH de la manière suivante : (1) permettre l'entrée du VIH dans ces cellules en induisant une fusion cellulaire avec des cellules immunitaires infectées, et (2) disséminer le VIH dans les tissus profonds, soit par interaction avec les cellules adjacentes, soit par production de VIH pseudotypés par la syncytine qui peuvent infecter des types de cellules autrement non permissives, en plus d'infecter des cellules immunitaires permissives dans les tissus profonds. La syncytine est exprimée de manière constitutive dans certains tissus, notamment le placenta et les testicules, et son expression peut être induite dans le cerveau après une infection par le VIH ce qui suggère que la syncytine-1 pourrait contribuer à la dissémination du VIH, à la persistance de l'infection et à l'établissement de réservoirs viraux dans d'autres tissus (14), Figure 10.

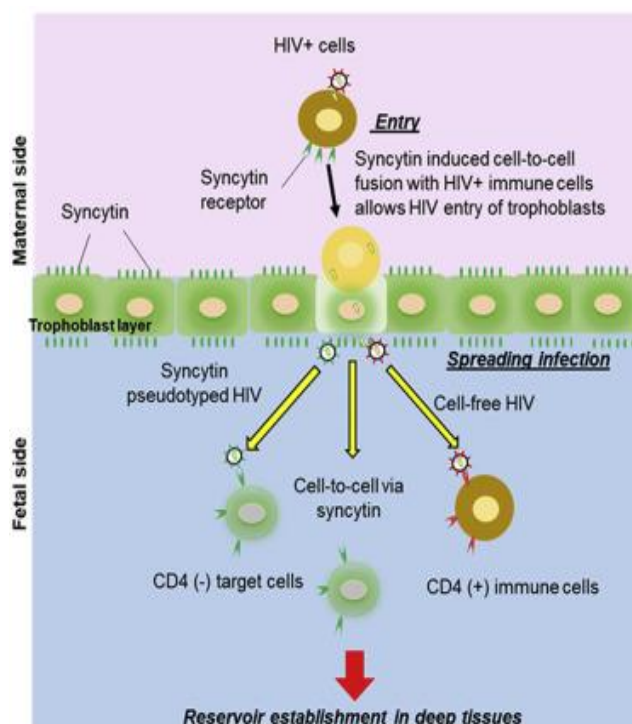


Figure 10 : La syncytine-1 induit la propagation du VIH-1 et établit des réservoirs de VIH dans le placenta. *Graphical abstract in Tang et al, 2020* (14)

Cette publication qui relie le monde des rétrovirus endogènes et celui des rétrovirus infectieux en démontrant un mécanisme d'entrée alternatif pour le VIH-1 dans les cellules trophoblastiques humaines m'a semblée fort à propos pour clore cette première partie de ce mémoire.

TRAVAUX REALISES A L'ANSES/LSAI/VAE

J'ai été recrutée à l'Anses en septembre 2005 en tant que Chargée de Recherche de classe 2 par voie de concours externe. De septembre 2005 à mai 2009, j'ai ainsi réalisé mes travaux de recherche au sein du Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSAI, site de Maisons-Alfort) de l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), dans l'unité des Virus des Aliments et de l'Eau (VAE), actuelle Unité des Virus Entériques (VE), dirigée par le Dr Sylvie Perelle.

Avec pour objectif d'améliorer la sécurité alimentaire sur le plan du risque viral, mes travaux de recherche portaient sur le développement et l'amélioration des méthodes de détection des virus entériques dans les aliments et l'eau. La détection de ces virus entériques, pour la plupart non cultivables, repose essentiellement sur l'emploi de méthodes de biologie moléculaire et notamment, l'utilisation de techniques de RT-PCR en

temps réel, développées dans l'unité.

J'ai piloté 2 projets qui sont détaillés ci-après et participé au démarrage de 2 autres projets de l'unité. En parallèle, j'étais impliquée dans les activités d'Appui Scientifique et Technique (AST) de l'unité dans le cadre de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives (TIACs).

1. Utilisation du bactériophage MS2 comme contrôle universel des diagnostics de détection des virus entériques à partir de prélèvements (eaux, aliments)

Ces virus sont transmis par voie féco-orale directe par contacts inter-humains ou indirecte via l'ingestion d'eaux ou d'aliments contaminés par des matières fécales. Parasites intracellulaires obligatoires, ils ont, à l'exception des adénovirus, un génome constitué d'acide ribonucléique (ARN). L'absence d'enveloppe à leur surface et la nature de leur génome leur confèrent une forte résistance aux conditions physico-chimiques extrêmes. Les virus entériques sont regroupés en différentes familles selon la pathologie qu'ils provoquent. On distingue ainsi les virus à l'origine de gastro-entérites, ceux aboutissant à une hépatite aiguë et d'autres induisant des pathologies diverses, comme par exemple le virus de la poliomyélite et de certaines méningites. Les virus les plus souvent incriminés dans les TIACs sont les norovirus humains (hNoV) (génogroupes I et II) responsables de gastroentérites et le virus de l'hépatite A (VHA), responsable d'hépatites aiguës (15).

La contamination des aliments par les virus entériques peut survenir à toutes les étapes de la chaîne alimentaire, depuis leur culture (eau environnementale et/ou eau d'irrigation souillées par des fèces) jusqu'à leur préparation et/ou transformation (contamination manuportée ou via des surfaces contaminées), ce qui représente un réel risque pour la santé des consommateurs (16),(17). Les aliments à l'origine de TIAC virales sont principalement des produits consommés crus ou peu cuits comme les mollusques bivalves, organismes filtreurs qui vont accumuler les particules virales au niveau de leurs glandes digestives, ou encore les fruits et légumes (notamment fruits rouges et salades), figure 11.

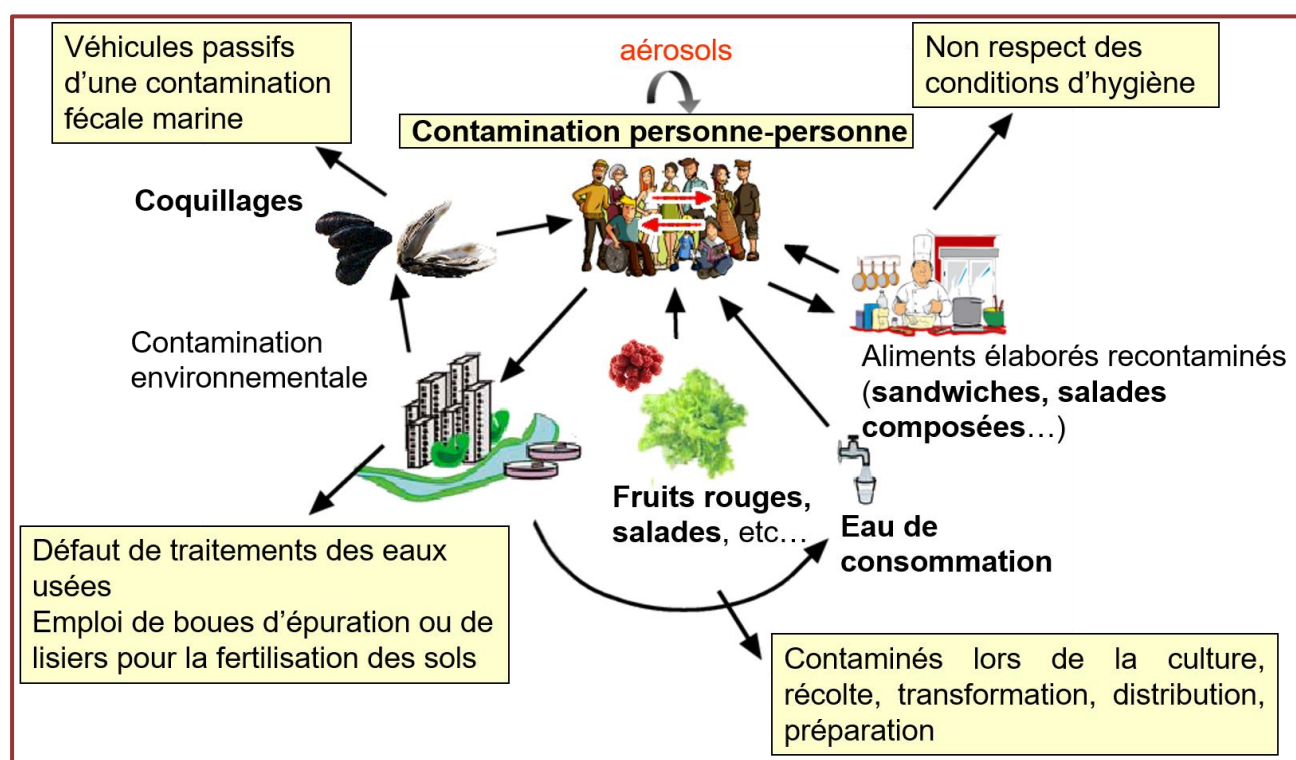


Figure 11 : Transmission des virus entériques par l'eau et les aliments

adapté de Perelle et Blaise-Boisseau, 2007 (18)

La recherche des virus entériques dans des matrices alimentaires est complexe et doit être adaptée en fonction de la nature de la matrice analysée. La première phase du processus analytique consiste en une étape d'élution / concentration des virus potentiellement présents à la surface des matrices. La seconde phase consiste en une détection des virus concentrés. La détection des virus entériques, pour la plupart non cultivables, repose essentiellement sur des méthodes de RT-PCR en temps réel qui permettent la détection des génomes viraux.

Il est cependant important de disposer d'un contrôle interne qui valide les différentes étapes (Elution / Concentration / Extraction des acides nucléiques viraux / RT-PCR en temps réel) de la recherche d'agents viraux dans les aliments et l'eau.

Nous avons développé une stratégie basée sur l'utilisation du bactériophage MS2 comme contrôle interne « universel » pour la détection du virus de l'hépatite A (VHA) dans les framboises et l'eau. Le bactériophage MS2 est un modèle de virus entérique, dont l'avantage est d'être sans danger pour l'homme ou l'environnement. Cette approche consiste à ajouter systématiquement une quantité déterminée de bactériophages MS2 aux prélèvements à investiguer, ce qui permet le contrôle de l'étape d'élution / concentration virale à partir de l'échantillon, le contrôle de l'extraction des acides nucléiques et le contrôle des inhibiteurs des réactions de PCR en temps réel. Ceci implique la mise au point de la détection, dans le même tube réactionnel, de la cible virale recherchée et du phage MS2 par RT-PCR en temps réel duplex. Des échantillons d'eaux et de framboises ont été contaminés artificiellement respectivement avec 1 à 10000 PFU de VHA / 1,5 L ou 50 à 5000 PFU de VHA / 25 g. Pour chaque matrice, trois répétitions ont été réalisées. Pour chaque expérimentation, deux séries d'échantillons ont été traitées (i) une série inoculée uniquement avec du VHA, et (ii) une série inoculée avec le VHA et 10^6 PFU de MS2. Après une étape d'élution / concentration des virus à partir des matrices artificiellement inoculées, les génomes viraux ont été extraits en utilisant l'automate NucliSens® easyMAG™ (BioMérieux). La détection des génomes du VHA et du bactériophage MS2 a été réalisée par la méthode de RT-PCR en temps réel duplex mise au point pour cette étude. Pour ce projet, j'ai essentiellement travaillé avec une assistante ingénieure de l'équipe, Catherine Hennechart-Collette.

La limite de détection (LOD) du VHA avec cette nouvelle approche était de 10 PFU pour 1,5 L d'eau embouteillée, 100 PFU pour 1,5 L d'eau du robinet, 50 PFU pour 25 g de framboises fraîches et 100 PFU pour 25 g de framboises congelées (**Figure 12**). Le rendement de récupération du VHA sur les framboises variait de 3 à 14% quand seul le VHA était inoculé et de 11 à 25% lorsque le MS2 était ajouté. Le rendement de récupération du VHA à partir d'eaux variait de 19 à 50% quand seul le VHA était inoculé et de 10 à 81% lorsque le MS2 était ajouté. Le rendement de récupération du MS2 était compris entre 8 et 54% selon la matrice considérée. L'ajout du bactériophage MS2 dans les échantillons ne diminue pas la LOD du VHA voire l'améliore et constitue donc un contrôle interne « universel » de choix pour le diagnostic viral. Nous avons proposé de définir un seuil d'efficacité d'extraction du MS2 (> 10 %, à moduler en fonction des matrices), pour chaque matrice, à partir duquel on valide ou invalide l'analyse. Cette stratégie de contrôle universel pourrait être étendue à la détection d'autres cibles virales d'intérêt dans les aliments et l'eau (Norovirus GGI et GGII, VHE, rotavirus...).

Panel A					
Inocula		Samples			
HAV (PFU)	MS2 (PFU)	Bottled water (1.5 L)		Tap water (1.5 L)	
		HAV recovery % (positive Ct data/ 6)	MS2 recovery %	HAV recovery % (positive Ct data/ 6)	MS2 recovery %
0	0	nd (0/6)	nd	nd (0/6)	nd
1	0	nd (0/6)	nd	nd (0/6)	nd
10	0	50 ± 11 (6/6)	nd	19 ± 12 (5/6)	nd
10 ²	0	47 ± 8 (6/6)	nd	28 ± 4 (6/6)	nd
10 ³	0	40 ± 6 (6/6)	nd	22 ± 4 (6/6)	nd
10 ⁴	0	46 ± 5 (6/6)	nd	29 ± 11 (6/6)	nd
0	10 ⁶	nd (0/6)	54 ± 16	nd (0/6)	17 ± 8
1	10 ⁶	12 ± nd (1/6)	48 ± 8	nd (0/6)	19 ± 2
10	10 ⁶	81 ± 24 (6/6)	64 ± 10	10 ± 5 (3/6)	18 ± 6
10 ²	10 ⁶	63 ± 13 (6/6)	52 ± 10	29 ± 11 (6/6)	15 ± 5
10 ³	10 ⁶	44 ± 6 (6/6)	47 ± 10	15 ± 5 (6/6)	8 ± 6
10 ⁴	10 ⁶	47 ± 3 (6/6)	26 ± 2	28 ± 7 (6/6)	12 ± 9
Panel B					
Inocula		Samples			
HAV (PFU)	MS2 (PFU)	Fresh raspberries (25 g)		Frozen raspberries (25 g)	
		HAV recovery % (positive Ct data/ 6)	MS2 recovery %	HAV recovery % (positive Ct data/ 6)	MS2 recovery %
0	0	nd (0/6)	nd	nd (0/6)	nd
50	0	17 ± 9 (5/6)	nd	7 ± 3 (4/6)	nd
10 ²	0	16 ± 4 (6/6)	nd	3 ± 2 (6/6)	nd
5 × 10 ²	0	12 ± 2 (6/6)	nd	5 ± 4 (6/6)	nd
10 ³	0	8 ± 3 (6/6)	nd	9 ± 4 (6/6)	nd
5 × 10 ³	0	14 ± 5 (6/6)	nd	9 ± 2 (6/6)	nd
0	10 ⁶	nd (0/6)	12 ± 4	nd (0/6)	29 ± 5
50	10 ⁶	25 ± 13 (6/6)	21 ± 2	14 ± 9 (3/6)	26 ± 12
10 ²	10 ⁶	14 ± 5 (5/6)	14 ± 6	8 ± 6 (6/6)	21 ± 4
5 × 10 ²	10 ⁶	14 ± 10 (6/6)	15 ± 9	14 ± 3 (6/6)	26 ± 4
10 ³	10 ⁶	16 ± 9 (6/6)	12 ± 3	11 ± 3 (6/6)	16 ± 3
5 × 10 ³	10 ⁶	14 ± 8 (6/6)	11 ± 4	11 ± 2 (6/6)	17 ± 4

Figure 12 : Taux moyens de récupération du VHA pour les différents niveaux d'ensemencement (avec ou sans ajout de MS2) et chaque matrice alimentaire. Pourcentage de récupération calculé pour le VHA et le MS2 dans l'eau embouteillée ou l'eau du robinet (panel A) et les framboises fraîches ou les framboises congelées (panel B). Le nombre de Ct positifs est mentionné pour le VHA. Le pourcentage moyen de récupération correspondant à la limite de détection pour chaque type d'échantillon est indiqué en italique. nd : non déterminé *adapté de Blaise-Boisseau et al, 2010* (19)

Par ailleurs, en parallèle de ces travaux, j'ai participé au projet européen Biotracer (« Improved biotraceability of unintended micro-organisms and their substances in food and feed chains », juin 2007-31 décembre 2010) pour la mise au point d'une méthode pour la détection moléculaire du virus de l'hépatite A dans l'eau minérale embouteillée. L'objectif de cette étude était de tester l'efficacité de différentes approches pour extraire l'ARN de l'eau embouteillée inoculée par le VHA. Trois méthodes ont été comparées (**Figure 13**) : Filtration de l'eau artificiellement contaminée par le VHA, puis élution/concentration des virus retenus sur le filtre avant extraction de l'ARN automatisée sur le bio-robot NucliSens easyMAG, au moyen de billes de silice magnétique (méthode 2) ou extraction manuelle sur colonnes de silice Qiagen (méthode 3) ou Extraction directe des ARN viraux retenus sur le filtre, sans étape de concentration, en utilisant le bio-robot easyMag (méthode 1).

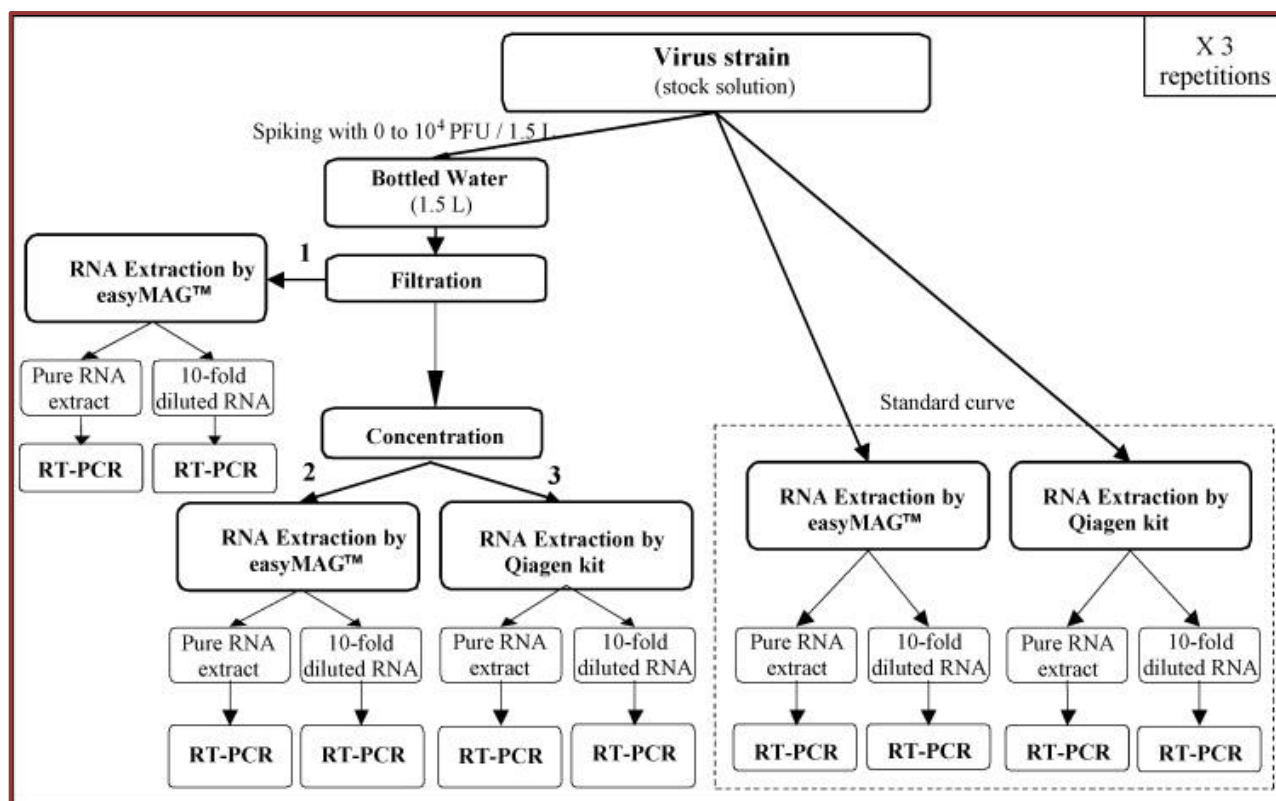


Figure 13 : Organigramme de l'analyse de l'eau embouteillée selon les procédures 1 à 3. Des échantillons d'eau embouteillée (1,5 L) ont été contaminés artificiellement avec 0, 1, 10, 102, 103 et 104 PFU de VHA. Des courbes standard ont été obtenues pour chaque méthode d'extraction de l'ARN en analysant des dilutions sériées de raison 10 de suspensions de VHA, de 0,01 à 104 PFU. Les performances des trois procédures (1 : filtration, extraction par NucliSens® easyMAG™ ; 2 : filtration, concentration, extraction par NucliSens® easyMAG™ ; 3 : filtration, concentration, extraction par Qiagen) ont été évaluées par RT-PCR en temps réel. *Perelle et al, 2009 (20)*

Une nouvelle approche rapide et simplifiée basée sur NucliSens easyMAG a ainsi été décrite et comparée à l'approche classique NucliSens easyMAG et aux purifications manuelles sur colonne à base de silice (Qiagen). La limite de détection (LOD) avec la nouvelle approche NucliSens easyMAG était d'environ 1PFU/1,5L contre environ 100PFU/1,5L en utilisant des traitements d'échantillons conventionnels qui comprenaient une étape de concentration par ultrafiltration.

Projet VIRENTERIC	Travaux publiés dans <i>Journal of Virological Methods</i> (23)
Projet BIOTRACER	Travaux publiés dans <i>Journal of Virological Methods</i> (24)

2. Impact de procédés utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sur la survie virale dans des matrices alimentaires végétales de type fruits rouges

De Janvier 2006 à Novembre 2008, j'ai participé en tant que chef de projet, au Projet ACTIA 05.7 « Thermo-inactivation des virus contaminant les fruits rouges surgelés importés d'Europe Centrale (potentiel synergique du pH) » coordonné par l'ADRIA-Normandie et qui impliquait différents partenaires publics et privés, dont l'unité VAE (Actuelle unité VE du LSAL). J'ai eu le plaisir de travailler avec Sarah Temmam et de l'encadrer. Sarah était alors une ingénieure employée par l'ADRIA Normandie, détachée dans notre unité dans le cadre de l'UMT TERESA.

Ce projet visait à étudier l'impact de procédés utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sur la survie virale dans des matrices alimentaires végétales de type fruits rouges. Ce projet a été initié suite à plusieurs épisodes de toxi-infections alimentaires collectives virales liées à la consommation de fruits rouges contaminés, majoritairement importés d'Europe Centrale. Pratiquement, ce projet a consisté à étudier l'impact de la thermisation et de l'acidification sur la survie de virus entériques modèles (Phage MS2, Virus de l'hépatite A) dans des préparations de fruits rouges artificiellement contaminées. Ce projet a démarré le 3 octobre 2005

pour l'ACTIA mais la signature de convention Afssa n'est intervenue que le 15 mai 2006. Ce projet avait une durée prévue de 30 mois. Les expérimentations ont pris fin en Octobre 2008. Le rapport final du projet a été rédigé et envoyé à l'ADRIA début décembre 2008. Le rapport de synthèse final a été envoyé en Janvier 2009 à l'ACTIA.

Brièvement, les principaux résultats sont les suivants : Les études d'inactivation du VHA en purée de framboises non acidifiée (pH 3,3) ont permis de montrer une nette chute du titre viral infectieux corrélée avec une augmentation de la température de traitement. Par ailleurs, un bénéfice de l'acidification a été observé puisque les cinétiques d'inactivation du VHA sont toujours plus rapides dans les purées acidifiées (quelque soit le pH et le type d'acide employé) que dans les purées non acidifiées (pH 3,3). Les facteurs qui accélèrent la chute du titre viral infectieux du VHA dans les purées sont : une température élevée ($75^{\circ}\text{C} > 70^{\circ}\text{C} > 65^{\circ}\text{C}$), un pH acide ($\text{pH } 2,5 > \text{pH } 3,0$) et la nature de l'acide employé pour l'acidification ($\text{HCl} > \text{acide citrique}$). Un modèle mathématique intégré utilisant ces résultats a été élaboré pour tenter de prédire le comportement viral en fonction de la température de traitement et du pH. Les prédictions calculées avec ce modèle intégré ont été vérifiées avec des données expérimentales de thermo-inactivation obtenues à 65, 70 et 75°C avec des purées de fraises (pH 3,3), framboises (pH 3) et myrtilles (pH 2,9) inoculées avec du VHA (**Figure 14**). La confrontation des simulations du modèle aux résultats expérimentaux a montré un niveau d'adéquation satisfaisant. Au terme de ce projet, il était possible d'envisager l'utilisation industrielle de l'approche intégrée pour prédire la population virale résiduelle au cours de traitements thermiques, compris entre 65 et 75°C , de purées de fruits rouges caractérisées par des pH compris entre 2,5 et 3,3.

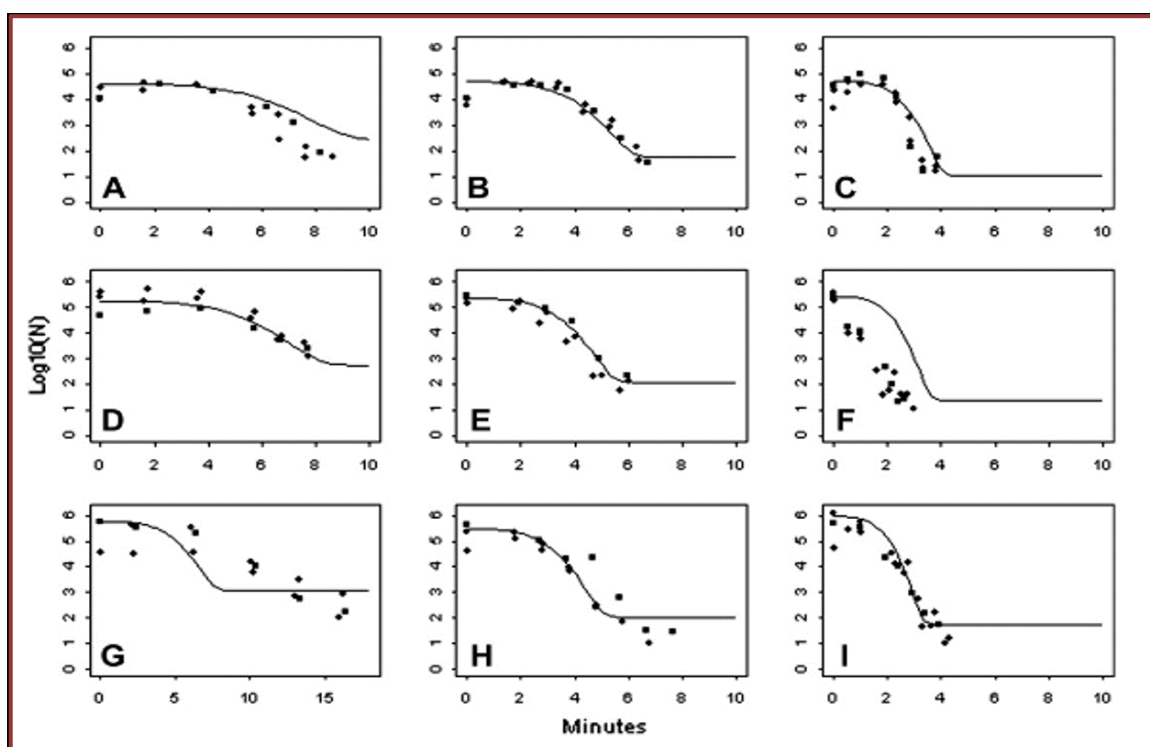


Figure 14 : Validation du modèle d'inactivation du VHA dans des purées de fruits rouges. Cinétique d'inactivation du VHA dans les fraises (pH 3,35) à 65°C (A), 70°C (B) et 75°C (C), dans les framboises (pH 3,05) à 65°C (D), 70°C (E) et 75°C (F), et dans les myrtilles (pH 2,87) à 65°C (G), 70°C (H) et 75°C (I) ; données expérimentales (symboles, 3 répétitions) et prédiction du modèle (ligne) *Deboosere et al, 2010* (21)

Projet **VIRENTERIC**

Travaux publiés dans *Food Microbiology* (22)

3. Détection du virus de l'hépatite E (VHE) dans les aliments et l'eau par RT-PCR en temps réel

Si ce virus entérique n'est pas le plus fréquemment impliqué dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), un certain nombre de publications faisaient en revanche état du risque zoonotique associé à ce virus et notamment sa possibilité d'être transmis du porc à l'homme via une contamination environnementale. En 2006, mes travaux ont porté sur la construction d'un témoin positif de réaction de PCR en temps réel et l'optimisation du modèle moléculaire. Sur ce thème, notre unité a établi une collaboration avec Nicole Pavio

(alors CR2, à présent DR1 dans l'UMR Virologie du LSA). De septembre à décembre 2007, après mon congé maternité, j'ai repris cette thématique VHE. Pratiquement, j'ai produit à partir de la construction plasmidique «contrôle positif», un ARN synthétique correspondant à une partie de la région de l'ORF3 conservée au sein des 4 génotypes du VHE. L'obtention de cet ARN standard nous a permis de travailler à l'optimisation des réactions de RT-PCR en temps réel sur lesquelles reposait alors la détection du virus VHE, virus non cultivable. Le développement de cette thématique pour la validation d'un diagnostic du VHE dans des prélèvements d'eaux et aliments était cependant conditionné à notre déménagement dans le pôle HQSA, actuel Bâtiment Monod, (pour un accès au laboratoire P3). Ce projet n'a donc pas été poursuivi en 2008 mais a été repris à partir d'octobre 2009 car l'unité VAE était depuis lors installée dans le bâtiment Monod et disposait d'un laboratoire NSB3. Depuis 2012, une étroite collaboration s'est construite et se poursuit entre l'unité VAE (Sandra Martin-Latil, chef de projet qui m'a succédé en 2009 en VE et qui depuis le 1^{er} octobre 2023 a intégré l'UMR Virologie du LSA) et l'équipe VEBE (Virus entériques et barrière d'espèces) de l'UMR virologie dirigée par Nicole Pavio et en charge des aspects zoonotiques du VHE.

Pour terminer cette partie consacrée à mes travaux au sein de l'équipe VE du LSA (ex VAE du LERQAP), j'ajouterai ma participation au projet ANR-07-PNRA-008 ADHERESIST (Janvier 2008- Décembre 2010) «Contamination de matrices alimentaires par des virus contaminant entériques (VHA, norovirus, entérovirus) : relations entre propriétés de surface, capacité d'adhésion et résistance induite aux traitements technologiques et hygiéniques » coordonné par C. Gantzer, UMR 7564 CNRS-UHP Nancy 1 - Laboratoire de chimie physique et microbiologie pour l'environnement (LCPME) et impliquant différents partenaires publics et privés, dont l'unité VAE de l'AFSSA LERQAP. Ce projet avait pour objectifs (i) de mettre en relation propriétés de surface de différents virus modèles et leur capacité d'adhésion ; (ii) d'évaluer la résistance des virus adhérents à des traitements technologiques et hygiéniques appliqués sur site de production et (iii) de proposer un germe de référence représentatif des principaux pathogènes et utilisable pour une évaluation en routine de l'efficacité virucide d'un traitement technologique. Ce projet a démarré le 01 janvier 2008 pour une durée de 36 mois (fin de projet prévue pour le 31/12/2010). Pratiquement, en 2008, nous avons tout d'abord travaillé à la standardisation des méthodes d'extraction virale et détection des génomes viraux par RT-PCR quantitative en temps réel. Ces méthodes ont été rédigées et nous avons également formé les partenaires travaillant sur la même matrice alimentaire que nous (salade). Nous avons ensuite commencé l'étude des capacités d'adhésion de virus entériques sur la matrice salade et une procédure a été élaborée pour assurer une reproductibilité des résultats entre laboratoires. Tout au long de l'année 2008, j'ai participé aux 5 réunions de travail rassemblant l'ensemble des partenaires impliqués et organisées à Paris (29 janvier, 11 mars, 12 juin, 15 septembre et 08 décembre). Les expérimentations se sont poursuivies sur le premier semestre 2009 et étaient déjà bien avancées lors de mon départ de l'unité VAE en juin 2009. Les résultats de ce projet ont été d'ailleurs valorisés par une publication dont je ne suis cependant pas co-auteur, ayant quitté l'unité VAE (22).

En 2021, 1 309 toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été déclarées en France, affectant 11 056 personnes, dont 512 (5%) se sont présentées à l'hôpital (hospitalisation ou passage aux urgences) et 16 (0,14%) sont décédées. Douze décès étaient liés à sept TIAC survenues dans des EPADH (norovirus suspecté pour 1 décès). Chaque année, une augmentation hivernale des TIAC provoquées par des virus entériques est rapportée (norovirus principalement). Environ la moitié de ces TIAC surviennent entre décembre et mars (entre 20 et 120 TIAC par an depuis 2006 représentant entre 6% et 23% des TIAC sur cette période), sur les (2% à 22%) sur les périodes décembre-janvier. La principale source d'infection suspectée est la consommation de coquillages, notamment les huîtres. En février 2021 un pic de TIAC suspectées ou confirmées à virus entériques a été observé, pour lesquelles les coquillages étaient l'aliment suspecté pour 79%. Les virus entériques restent donc toujours d'actualité pour la prévention des TIACs.(source Santé publique France (23)

Par ailleurs, au printemps 2020, 43 personnes habitant l'Ain ont souffert de méningites, de méningo-encéphalites ou de symptômes grippaux causés par une contamination par le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV). Elles avaient toutes consommé du fromage de chèvre au lait cru. La problématique TBEV transmis par les aliments est à présent incluse dans les missions de l'équipe VE du LSA en collaboration et transversalité avec l'UMR virologie du LSA.

TRAVAUX REALISES A L'ANSES/LSAn/UMR VIROLOGIE/BIOPIC

Désireuse d'appliquer mes compétences en virologie et biologie moléculaire au domaine de la santé animale et de rejoindre une unité mêlant référence, développement de méthodes et recherche fondamentale et/ou appliquée, j'ai posé ma candidature pour un poste de chargée de recherche dans l'UMR de virologie du LSAN (ex LERPAZ) dans le cadre d'une mobilité interne, en mars 2009. Ma candidature ayant été retenue, j'occupe depuis le 1er Juin 2009 la fonction de chargée de recherches dans l'UMR de virologie et plus précisément au sein de l'équipe « Biologie des Picornavirus » (BioPIC) sous la responsabilité du Dr Labib Bakkali-Kassimi. A mon arrivée en 2009 l'équipe était en charge du Laboratoire National de Référence (LNR) Fièvre aphteuse et maladies vésiculeuses. Nous avons ensuite obtenu le mandat de LR OMSA (fondé en tant qu'OIE) en 2015 puis, en 2018, le mandat de centre de référence FAO et en 2019 de LRUE fièvre aphteuse, en consortium avec le Sciensano en Belgique.

L'équipe BioPic mène des activités de référence fortes soutenues par des activités de recherche directement liées aux mandats de référence dont elle est responsable. Dans le cadre du mandat LRUE, l'équipe anime un réseau de plus de 40 laboratoires européens pour lesquels elle organise annuellement un essai interlaboratoire d'aptitude et un atelier scientifique. L'équipe anime également un réseau de 4 laboratoires nationaux dans le cadre de son mandat LNR fièvre aphteuse. Afin de fournir des services de diagnostic de qualité, l'équipe mène ses activités de diagnostic sous assurance qualité avec des méthodes accréditées selon la norme ISO 17025. Les activités de référence de l'équipe BioPIC sont soutenues par la recherche appliquée et fondamentale portant sur : a) les interactions hôte/pathogène, b) le développement/l'amélioration d'outils diagnostic, c) l'épidémiologie moléculaire et d) les vaccins. Les projets de recherche sont concentrés sur le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) et visent à améliorer la compréhension des mécanismes de persistance du FMDV, à caractériser les souches virales circulant dans les pays endémiques, à développer des méthodes de diagnostic pour améliorer la détection et la caractérisation du FMDV et à développer des vaccins de nouvelle génération. L'équipe développe des collaborations avec d'autres équipes de l'unité (I5/BIOR et THAI) ainsi que d'autres laboratoires et instituts internationaux.

Après une partie introductive sur la fièvre aphteuse pour présenter le contexte et ma thématique de recherche, je suivrai les 4 axes précédemment cités pour résumer mes travaux de recherche au sein de l'équipe BIOPIC depuis juin 2009 jusqu'à septembre 2023.

1. Contexte et Thématique de mes travaux de recherche : La fièvre aphteuse, une maladie animale virale ancienne mais toujours d'actualité

NB : Cette partie 1 reprend des éléments de texte et figures de notre récente revue sur la fièvre aphteuse pour la revue Virologie (24)

La fièvre aphteuse (FA) est l'une des maladies virales animales les plus contagieuses. Bien que très ancienne, la FA reste une maladie transfrontalière toujours d'actualité et représente une menace permanente de réémergence pour les pays indemnes. Le virus de la FA ou FMDV (pour Foot-and-Mouth Disease Virus), de la famille Picornaviridae, genre Aphthovirus, affecte les artiodactyles domestiques comme sauvages (principalement bovins, ovins, caprins, porcins, camélidés et cervidés). La fièvre aphteuse a un impact socio-économique considérable sur la production et le commerce agricoles en zone d'enzootie mais également en cas d'incursion dans une zone précédemment indemne comme ce fut le cas en 2001 en Europe. Par sa grande variabilité génétique et antigénique, l'absence d'immunité croisée entre ses sept sérotypes, sa capacité de survie dans l'environnement, sa grande contagiosité, son large spectre d'hôtes ainsi que sa biologie particulière, ce virus reste d'intérêt majeur en santé animale et l'objet de nombreux travaux de recherche, de la biologie fondamentale au diagnostic en passant par la surveillance et les moyens de lutte (24).

1.1 La fièvre aphteuse : historique de la maladie

1.2

La FA est une maladie ancienne, connue depuis l'Antiquité. Sa première description est cependant attribuée à Hieronymus Fracastorius qui, en 1546, a décrit une épizootie survenue chez des bovins près de Vérone, en Italie (**Figure 15**). Dans ses écrits, Fracastorius décrit une maladie hautement contagieuse ne touchant que le bétail, les animaux atteints présentant des aphtes dans la cavité buccale et sur les pieds. C'est cependant à Francisco Toggia et à ses observations dans le Piémont en 1799 que la fièvre aphteuse doit son nom.

La maladie est ensuite apparue fréquemment en France, en Allemagne et en Italie au cours des XVII^e et XVIII^e siècles. Sa première description en Asie remonte à 1842, en Amérique du Sud à 1871 et en Afrique à 1892. En 1897, Loeffler et Frosch mirent en évidence la nature virale de l'agent responsable de la fièvre aphteuse, une découverte historique puisqu'il s'agissait de la première démonstration d'une maladie animale causée par un agent filtrable, et donc le premier virus animal découvert.

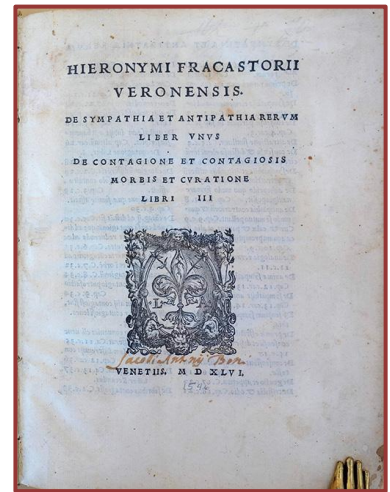


Figure 15 : Première description écrite de la fièvre aphteuse (25)

Une autre découverte majeure dans l'histoire de la fièvre aphteuse a été réalisée par Vallée et Carrée en 1922 puis par Waldmann et Trautwein en 1926 lorsqu'ils ont démontré qu'il existait différents types antigéniques du virus de la FA (sérotypes). Le sérotype A (Ardennes) et le sérotype O (Oise) ont été identifiés en France puis le sérotype C en Allemagne. Cette découverte sérologique présente des implications importantes pour le contrôle de la maladie par vaccination car après infection par un virus d'un sérotype donné, aucune protection croisée n'est induite contre l'infection par d'autres sérotypes. Quatre autres sérotypes, trois sud-africains SAT 1, 2 et 3 (South African Territories) et un sérotype asiatique (Asia 1) ont été ensuite identifiés en 1934 et 1954 respectivement. Le développement, dans les années 1930, de techniques in vitro pour la multiplication du virus a été crucial pour la production à grande échelle de vaccins et pour le dosage de l'infectiosité du virus. Ceci combiné aux travaux sur l'action du formol sur le virus provenant de l'épithélium lingual de bovin infecté avec des études d'adsorbabilité du virus de la FA sur hydroxyde d'aluminium ont permis d'obtenir le premier vaccin contre la fièvre aphteuse : un virus inactivé au formol, adsorbé sur hydroxyde d'aluminium et chauffé. Les programmes de vaccination lancés en Europe dans les années 50 ont permis par la suite d'éradiquer la maladie en Europe puis d'arrêter la vaccination dans l'Union européenne en 1991. La fièvre aphteuse reste cependant toujours d'actualité dans de nombreuses autres parties du monde et une réémergence en Europe ne peut pas être exclue. La détection récente de foyers en Turquie ainsi qu'en Tunisie nous rappelle que cette maladie est en effet aux portes de l'Europe et que cette menace ne doit pas être négligée.

1.3 Le virus de la fièvre aphteuse

Le virus responsable de la FA ou FMDV pour « Foot-and-Mouth disease virus », appartient au genre *Aphthovirus* dans la famille *Picornaviridae*. Les Picornavirus sont de petits virus non enveloppés ayant une capsid caractéristique de symétrie icosaédrique et un génome à ARN simple brin, de polarité positive, d'une longueur comprise entre 6,7 et 10,1 kb. La taille du génome du FMDV est d'environ 8,5kb, contenu dans une capsid de 25 à 30nm de diamètre divisée en 60 unités, elles-mêmes organisées en 12 pentamères. Ces pentamères sont composés des quatre protéines structurales du virus de la FA, les protéines virales (viral protein) VP1, VP2, VP3 et VP4. Chacune de ces protéines est ainsi présente à raison de 60 monomères par capsid. Le génome du virus de la FA, constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive, a une taille d'environ 8,5 kb. Cet ARN génomique a la particularité d'être lié de façon covalente, via son extrémité 5', à une petite protéine du virus nommée VPg (viral genome linked protein), essentielle à la réplication virale (**Figure 16**).

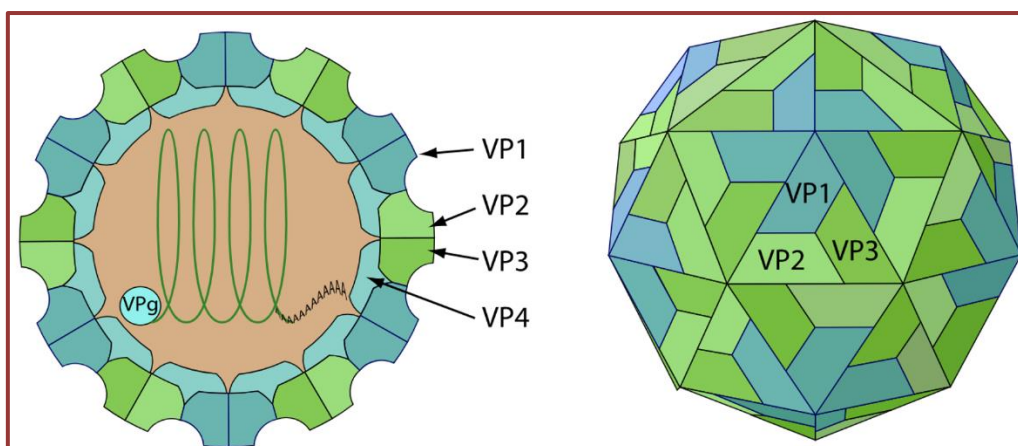


Figure 16 : Capside du virus de la fièvre aphteuse entourant le génome d'ARN nu. La capside consiste en un arrangement icosaédrique de 60 protomères, chacun consistant en 4 polypeptides, VP1, VP2, VP3 et VP4. VP4 est située sur la face interne de la capside. (<https://viralzone.expasy.org/98>)

Le génome du virus de la FA ne comprend qu'un unique cadre de lecture ouvert codant une unique polyprotéine de près de 2300 acides aminés, qui, après une succession de clivages essentiellement opérés par les protéases virales Lpro (existant sous deux formes, Lab pro et Lb pro) et 3C, aboutit à différents précurseurs et in fine, 15 protéines matures structurales et non structurales (**Figure 17**).

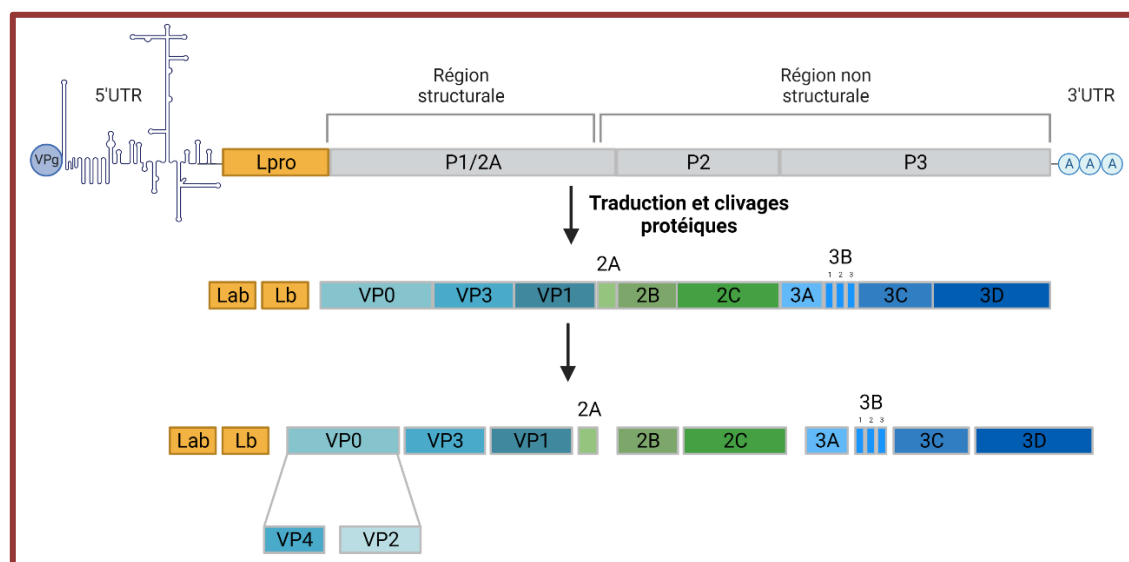


Figure 17 : Structure du génome du virus de la fièvre aphteuse et expression des protéines virales
Adapté de Sarry et al. 2022 (26)

Parmi ces protéines, les quatre protéines structurales sont impliquées dans l'architecture de la capside et 11 protéines non structurales, que sont Lab pro, Lb pro 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C et 3D, impliquées dans l'accomplissement du cycle viral ainsi que dans l'échappement du virus à la réponse de l'hôte.

La faible fidélité de la polymérase virale et le cycle réplcatif court du virus de la FA favorisent l'émergence de quasi-espèces virales au sein de l'hôte infecté. Sept sérotypes immunologiquement distincts ont été caractérisés pour le virus de la FA. Il est à noter qu'aucun cas de sérotype C n'a été confirmé, dans le monde entier, depuis plus de 15 ans. La probable extinction de ce sérotype pose la question du maintien de son utilisation à des fins diagnostiques ou vaccinales en regard du risque d'échappement de ce sérotype des laboratoires. La grande variabilité de la région VP1 permet de classer moléculairement les virus de fièvre aphteuse en topotypes, lignages et sous-lignages. Ce spectre de « sous-types » diversifié est le résultat d'un processus de sélection équilibré entre la pression de sélection immunitaire et la conservation des propriétés d'attachement aux cellules, d'entrée et d'internalisation du virus. Les possibilités d'adaptation de chaque souche virale corrént de ce fait à des déterminants antigéniques critiques, décisifs dans la réussite de la protection vaccinale mais également dans l'infection des cellules cibles et la transmissibilité.

1.4 Spectre d'hôtes et modes de transmission

Le virus de la FA se caractérise par un très large spectre d'hôtes : plus de 70 espèces, essentiellement les artiodactyles (mammifères ongulés à nombre pair de doigts), sauvages ou domestiques. Parmi les espèces domestiques figurent de nombreuses espèces d'intérêt économique majeur tels que les bovins, les ovins, les caprins et les porcins. De nombreuses espèces sauvages sont sensibles au virus : antilopes, sangliers, cerfs, chameaux ou encore buffles d'Asie et d'Afrique. Ces derniers sont notamment considérés comme jouant un rôle important en tant que réservoirs de virus dans certains pays. Chez l'humain, seuls de très rares et anecdotiques cas cliniques bénins ont été signalés.

La fièvre aphteuse est une maladie hautement contagieuse, induisant un taux de morbidité proche de 100 % chez les espèces sensibles. Sa transmission peut s'effectuer par contact direct entre animaux infectés et animaux sains. Cette voie directe est notamment très importante chez les porcs qui excrètent en phase aiguë de grandes quantités de virus. La transmission peut également s'effectuer par contact indirect *via* des vecteurs animés (personnes ou animaux) ou inanimés (« fomites » : véhicules, outils agricoles). Les conditions climatiques peuvent également contribuer à la dissémination virale. La capacité remarquable du virus de la FA à survivre dans l'environnement en dehors de son hôte explique en grande partie la très grande dissémination de la fièvre aphteuse, avec des variations selon la souche virale considérée (composition de la capside) et les conditions de température et humidité. Les carcasses d'animaux infectés peuvent également être des sources importantes de virus. Si la contagiosité de la fièvre aphteuse est liée aux propriétés physico-chimiques de son agent viral et à ses capacités de survie dans l'environnement, elle est aussi liée au très court cycle viral du virus de la FA, accompli entre 4 à 6 heures selon la multiplicité d'infection considérée.

1.5 Signes cliniques et progression de l'infection

La dose infectieuse du virus de la FA varie selon l'espèce hôte et la voie d'exposition mais reste très faible. Les signes cliniques sont également dépendants de l'hôte ainsi que de la virulence propre à la souche à l'origine du foyer.

Chez un animal non immunisé, l'infection par le virus de la FA se caractérise par une phase d'incubation (infection préclinique) suivie d'une étape de dissémination virale (virémie). Le stade clinique de la FA se caractérise par une hyperthermie, l'apparition de vésicules ou aphtes au niveau de tous les épithéliums, un état d'abattement et une perte d'appétit. Les signes cliniques sont assez nets chez les bovins domestiques (« révélateurs ») – entraînant des pertes de production grave, notamment chez la vache laitière – mais moins marqués chez les petits ruminants (disséminateurs/ introducteurs) et chez le buffle africain (infection subclinique). Les porcs sont particulièrement sensibles au virus de la FA et la phase clinique est souvent sévère. De plus, les porcs représentent de véritables amplificateurs de virus. Porcs et petits ruminants présentent souvent des boiteries, conséquences directes de lésions podales (**Figure 18**). Si le taux de morbidité des bovins et porcins peut atteindre 100 %, le taux de mortalité associé à la fièvre aphteuse est relativement faible, essentiellement lié à des myocardites survenant chez les jeunes animaux.

L'infection primaire par le virus de la FA se produit dans les cellules épithéliales de la muqueuse de l'oropharynx ou du nasopharynx selon les espèces cibles. Même si comme de nombreux virus, le virus de la FA a développé différentes stratégies pour contrer la réponse innée, première ligne de défense de la cellule hôte, il induit cependant une forte réponse systémique. Des anticorps spécifiques du virus de la FA sont en effet détectables 4 à 7 jours après exposition virale. Si la virémie est de courte durée, le virus est en revanche présent jusqu'à 14 jours au niveau des lésions épithéliales.



Figure 18 : Signes cliniques et lésions. Chez les bovins : a) jetage nasal ; b) bouche, lésion fraîche ; c) lésion de la langue ; d) lésion interdigitée ; e) lésions des mamelles. Chez les porcins : f) groin, vésicules non rompues ; g) patte, lésion avec détachement de l'onglon ; h) groin, lésion fraîche ; i) lésion interdigitée ; j) porc présentant des lésions sur les pattes ; chez les petits ruminants : k) vésicule fraîchement rompue sur la langue d'une chèvre ; l) lésion sur la langue d'un mouton ; m) pied de mouton avec une lésion de la bande coronaire cicatrisée ; n) lésion interdigitée chez une chèvre ; o) la boiterie est généralement le premier signe de la fièvre aphteuse chez les moutons. *Sarry et al, 2022* (24)

1.6 Persistance virale chez les ruminants

Après la phase clinique, plus de 50% des ruminants infectés entrent dans une phase de « transition » au cours de laquelle soit le virus est éliminé soit ce dernier persiste. Cette persistance du virus de la FA chez les ruminants a été décrite dès la fin des années 1950 et est définie par la présence de virus infectieux dans les prélèvements oropharyngés plus de 28 jours après infection, indépendamment du statut vaccinal de l'animal. La durée de portage de ce virus infectieux varie selon l'espèce : jusqu'à 2,5 ans chez les bovins domestiques, neuf mois chez les petits ruminants et plus de cinq ans chez le buffle africain.

Cette persistance du FMDV a été décrite chez les bovins et les petits ruminants mais pas chez le porc qui élimine le virus en quatre semaines. Les porteurs sains, ruminants guéris suite à une infection par le virus de la FA, constituent une autre source de contamination. Si la probabilité de transmission du virus à partir de ces individus est considérée comme faible, le grand nombre de porteurs sains associés à la grande diversité d'hôtes de ce virus en font une menace réelle et non négligeable. De plus, il a été montré récemment qu'en cas de surinfection par une autre souche du virus de la FA, les porteurs sains constituent une source d'émergence de nouveaux recombinauts susceptibles d'être excrétés dans leur environnement. Il a ainsi été montré dans le cadre d'infections expérimentales « échelonnées », la présence de virus de la FA recombinant présentant la région codante non structurale du virus « persistant » (de type A) et la partie structurale du virus de type O utilisé pour la surinfection. L'analyse génomique a pu démontrer que la pression immunitaire de l'hôte est un facteur important de l'émergence de ces recombinauts, qui tous possèdent des régions codant pour la capsid, dérivées du virus surinfectant contre lequel les animaux n'avaient pas d'anticorps détectables au moment de la surinfection.

La persistance du FMDV reste un obstacle au contrôle de la FA. Les nombreuses études menées depuis plus de cinquante ans pour décrypter la persistance du FMDV ont permis de mettre en évidence une coévolution entre le virus et son hôte lors d'une infection persistante. Cependant les mécanismes sous-jacents restent encore à ce jour largement méconnus. Explorer ces mécanismes est l'objet de mes travaux de recherche au sein de l'équipe Biopic depuis mon arrivée en juin 2009.

1.7 Vaccination anti Fièvre aphteuse

La protection contre la fièvre aphteuse est corrélée à la présence d'anticorps neutralisants mais la grande diversité antigénique des virus de la FA et l'absence d'immunité croisée même au sein d'un sérotype, contribuent à la complexité de la vaccination anti fièvre aphteuse. Il est en effet essentiel que le vaccin déployé

soit efficace contre la souche de terrain circulante.

Les vaccins conventionnels actuels, développés dans les années 1960 sont produits sur cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney, cellules de rein de hamster nouveau-né) cultivées en suspension et inactivés par le BEI (éthylèneimine binaire, technique mise au point en 1976). Leur production est réalisée dans des laboratoires de haut niveau de confinement et nécessite une étape de purification pour obtenir des capsides dépourvues de protéines non structurales contaminantes qui seront formulées avec adjuvant (huile, aluminium ou saponine). Cette purification permet l'utilisation ultérieure de tests sérologiques basés sur la détection des anticorps dirigés contre ces protéines virales non structurales (PNS, liées à l'accomplissement du cycle viral chez l'animal infecté et donc « témoins » de l'infection virale), afin de distinguer des animaux vaccinés avec ce type de vaccin hautement purifié et les animaux infectés (concept DIVA, pour « *differentiating infected from vaccinated animals* », i.e distinguant les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement).

La vaccination protège contre l'apparition des signes cliniques mais ne prévient pas la persistance virale chez les ruminants. De plus, seuls les vaccins hautement purifiés permettent la distinction ultérieure entre animal vacciné et animal infecté. Une autre limitation des vaccins actuels repose sur l'évolution génétique et donc antigénique constante, des virus circulants, incluant les recombinaisons (y compris chez les animaux porteurs sains comme rapporté plus haut) et les phénomènes de trans-encapsidation. Lors de coinfections par le virus de la FA, la production de particules virales chimériques contenant le génome d'un virus entièrement encapsidé dans les protéines codées par l'autre virus co-infectant a été mise en évidence *in vitro*. La trans-encapsidation peut ainsi permettre un échappement complet aux anticorps neutralisants qui reconnaissent alors seulement les capsides codées par le génome encapsidé, permettant ainsi l'infection d'un hôte immunisé. Il faut donc en permanence produire des vaccins adaptés aux virus circulants et prédire leur efficacité par des tests de concordance vaccinale.

Malgré plusieurs décennies de recherche, seuls les vaccins inactivés hautement purifiés sont utilisés actuellement. Les perspectives en matière d'amélioration des vaccins anti-FA reposent actuellement sur trois types de stratégies : la production puis purification de pseudoparticules virales, l'utilisation de vecteurs défectifs pour la réplication permettant la production de capsides vides directement chez l'animal hôte mais également le recours à des virus vivants atténués comme souches vaccinales plus sûres en termes de biosécurité et potentiellement moins coûteuses à produire. Des vaccins sous-unitaires ou vaccins ADN ou encore vivants vectorisés (basés sur l'adénovirus par exemple) n'ont qu'un usage très limité faute d'efficacité. L'amélioration des vaccins avec notamment le développement de vaccins « marqueurs » reste donc un défi en termes de contrôle et de lutte contre la fièvre aphteuse.

1.8 Distribution spatio-temporelle et épidémiologie moléculaire

La FA est aujourd'hui enzootique dans la plupart des pays d'Afrique et d'Asie, et sporadique en Amérique du Sud. Les programmes de contrôle et de prévention contre la fièvre aphteuse (progressive control pathway, PCP) mis en place par la FAO/l'EuFMD (European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease)/l'OMSA sont largement dépendants de la connaissance du statut de chaque pays vis-à-vis de la maladie et de la distribution spatiotemporelle des différents virus de la FA.

Les avancées en biologie moléculaire ont permis la caractérisation génétique des souches isolées de foyers épidémiques avec une grande précision et une relative rapidité. Il a alors été proposé de définir, pour les régions enzootiques, sept pools géographiques présentant des virus de même sérotype représentés en **Figure 19**. Ces présences concomitantes au sein des pools résultent le plus souvent de similarités écologiques, d'échanges commerciaux d'animaux entre territoires conjoints et de traditions culturelles partagées concernant les pratiques d'élevage.

À partir des données génétiques, il est possible de tracer et de suivre les migrations de certains lignages du virus de la FA à l'échelle mondiale, particulièrement ceux dont les propriétés favorisent leur diffusion sporadique au-delà de leur région endémique initiale vers d'autres pools. Ce fut le cas pour le lignage O/ME-SA/Ind-2001 qui a réalisé plus de 15 échappements hors de sa région d'origine (pool 2) durant la période 2013-2017. Après sa réémergence en 2008 en Inde, il a en effet été détecté en 2013 en Asie du Sud-Est (pool 1), avant d'atteindre le statut de pandémie en se propageant vers le Moyen-Orient, l'Arabie saoudite (pool 3) et la Libye puis de toucher en 2014-2015 la Tunisie, l'Algérie, le Maroc et l'île Maurice à l'été 2016 (pool 6). De manière similaire, le topotype O/EA-3 a migré depuis sa région d'origine en Afrique de l'Est dans un mouvement ascendant vers le nord-est (Egypte avant 2004 puis Moyen-Orient autour de 2014) et dans un mouvement longitudinal vers l'ouest africain (2004-2008) avant de se propager au nord-ouest (2014-2018) pour atteindre Algérie, Tunisie et Maroc en 2018-2019. Ces exemples démontrent le caractère imprévisible de la diffusion du virus de la FA à l'heure de la mondialisation et cette particularité exacerbe le besoin d'établir une stratégie intégrée de lutte comprenant la coordination globale et régionale des efforts pour le contrôle et la surveillance de la fièvre aphteuse.

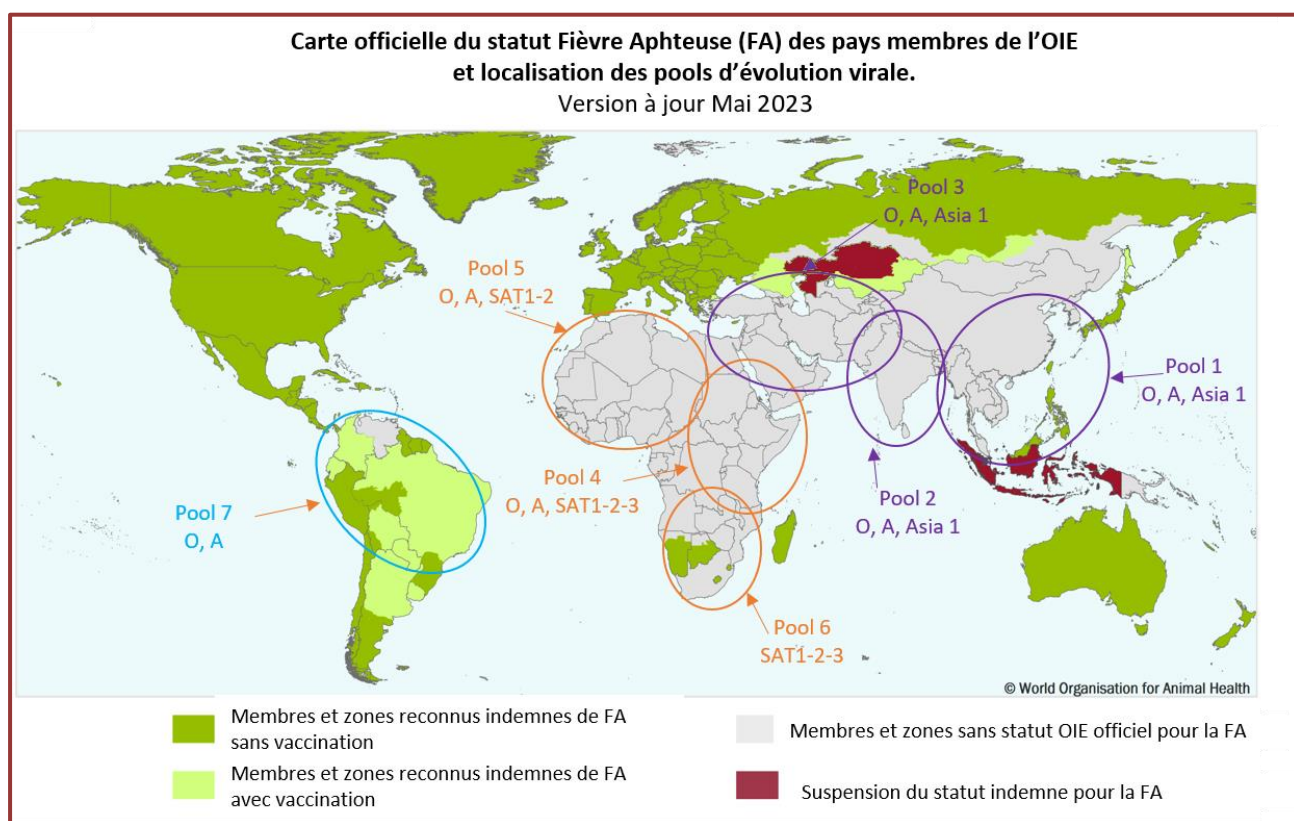


Figure 19 : Situation mondiale de la fièvre aphteuse : carte officielle du statut fièvre aphteuse des pays membres de l'OMSA (ex OIE) et localisation des pools de virus. *D'après Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) et adapté de Hammond, et al. Viruses 2021 (27), avec mise à jour de Mai 2023.*

1.9 Diagnostic

La confirmation de l'infection des animaux par le virus de la FA est réalisée par la mise en évidence du virus et/ou ses constituants. Pour les animaux infectés de façon aiguë, dès l'apparition des signes cliniques, les échantillons préférentiels sont le liquide vésiculaire et l'épithélium provenant de vésicules non rompues ou fraîchement rompues. Le sérum, la salive, les écouillons pharyngés ou le lait peuvent servir de source alternative de virus. En raison d'une courte virémie débutant avant l'apparition de signes cliniques et chutant ensuite très rapidement, le sang n'est pas un échantillon de choix. En cas de mortalité chez les jeunes animaux, le muscle cardiaque peut être utilisé pour le diagnostic. Chez les ruminants infectés de façon chronique (« porteurs »), le virus peut être mis en évidence dans des échantillons de liquide oropharyngé prélevés à l'aide d'un « probang ». Le virus de la FA étant sensible à la température et au pH, les échantillons doivent être immédiatement réfrigérés ou congelés. L'OMSA préconise l'utilisation d'un milieu de transport, décrit dans le Manuel terrestre (28). Tous ces échantillons doivent être transportés conformément aux réglementations internationales.

Ensuite, en fonction du contexte épidémiologique et de la situation sanitaire, différents types d'analyses de laboratoires sont mises en place, répondant ainsi à des objectifs distincts (**Figure 20**) y compris le recours au diagnostic différentiel par rapport à : la stomatite vésiculeuse, la maladie vésiculeuse du porc et maladie due au Senecavirus A (SVV), pour lesquelles l'Europe est également indemne (sauf foyer de SVV en juin 2022 au Royaume-Uni, 1^{ère} description de la maladie en Europe, déclarée en janvier 2023).

La présence du virus de la FA peut être mise en évidence par la détection de l'ARN viral, des protéines virales ou du virus vivant. La détection de l'ARN viral est généralement réalisée à l'aide d'une RT-PCR en temps réel qui détecte le génome de tous les sérotypes du virus de la FA. La confirmation d'un résultat positif s'effectue généralement par la mise en évidence des protéines virales par ELISA antigénique et/ou par l'isolement du virus vivant sur culture cellulaire. L'ELISA de capture d'antigène utilise des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques du sérotype et permet donc également d'identifier le sérotype du virus. Cette technique étant adaptée au diagnostic du virus de la FA dans le liquide vésiculaire et l'épithélium frais, pour la plupart des autres types d'échantillons, il est nécessaire d'amplifier d'abord le virus sur culture cellulaire. Des

lignées cellulaires établies sont maintenant couramment utilisées pour réaliser le test d'isolement viral. Lorsque le virus se réplique dans les cellules, l'effet cytopathique (ECP) est observé au microscope optique. La formation d'un ECP à part entière peut toutefois prendre jusqu'à 48 h voire 72 heures. Il peut également être nécessaire d'effectuer plus d'un passage avant d'observer l'ECP. Une fois l'ECP observé, la présence de virus FA dans le surnageant de ces cellules lysées doit être confirmée par une autre méthode telle que la RT-PCR ou l'ELISA de capture d'antigène. Le surnageant cellulaire peut également être utilisé pour la caractérisation du sérotype par ELISA antigénique ou par des méthodes moléculaires. En raison de la grande diversité génétique et antigénique du virus de la FA et sa sensibilité aux conditions de conservation, il est conseillé de combiner plusieurs tests de diagnostic pour améliorer sa détection et l'identification du sérotype impliqué.

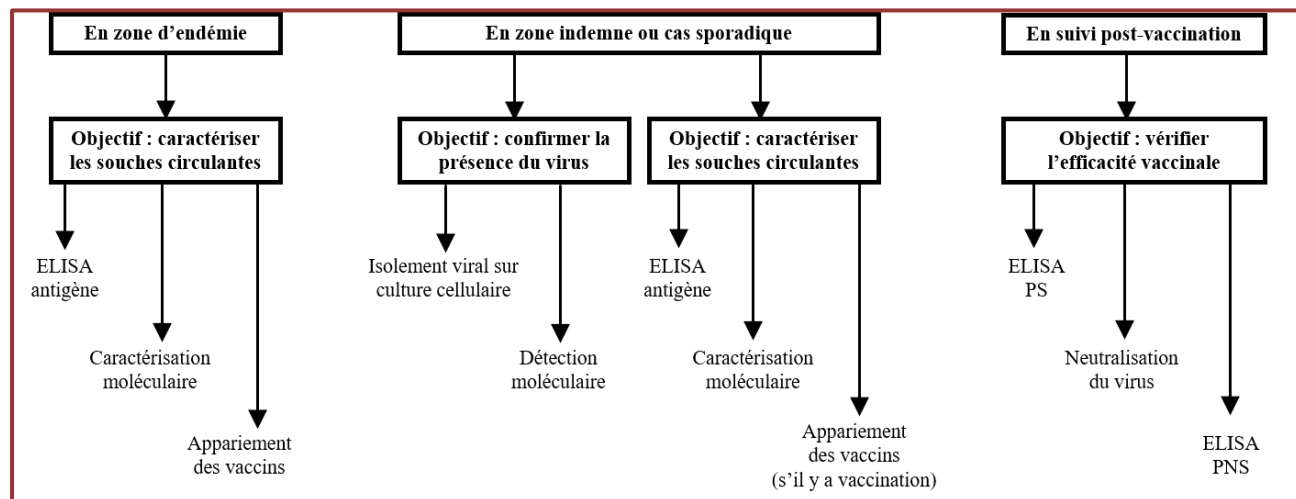


Figure 20 : Analyses de laboratoire à mettre en place en priorité, en fonction du contexte épidémiologique et sanitaire PS : protéines structurales ; PNS : protéines non structurales. *Sarry et al, 2022* (24)

Les méthodes de caractérisation moléculaire les plus courantes reposent sur des RT-PCR spécifiques du sérotype, souvent associées au séquençage et à une analyse phylogénétique. Le séquençage du gène VP1, gène le plus variable du virus de la FA, permet non seulement de révéler ou de confirmer le sérotype impliqué mais aussi, par l'analyse phylogénétique associée, d'identifier précisément le topotype et d'obtenir ainsi des informations sur l'épidémiologie moléculaire du virus. Les méthodes de RT-PCR en temps réel, d'ELISA antigénique et de caractérisation moléculaire peuvent être appliquées sur des échantillons inactivés et peuvent donc être réalisées dans des installations autorisées de niveau de sécurité biologique 2 (NSB2). Les tests utilisant le virus vivant de la FA ou des échantillons non inactivés ne peuvent être réalisés que dans des installations NSB3 spécialement conçues et autorisées répondant à des normes de biosécurité telles que celles décrites par l'EuFMD. L'EuFMD est la commission de contrôle et de lutte contre la FA, créée en 1954 par la FAO puis placée plus tard sous l'égide de l'Union européenne.

Il existe également des outils de diagnostic utilisables directement sur le terrain, par exemple les tests immunochromatographiques sur bandelettes ou les dispositifs de biologie moléculaire portables RT-LAMP. Ces tests donnent une indication rapide de la présence ou de l'absence du virus de la FA dans un troupeau. Cependant, leur sensibilité est insuffisante pour s'appuyer uniquement sur ce genre de test pour diagnostiquer la fièvre aphteuse sans confirmation supplémentaire en laboratoire.

Une semaine après l'apparition des lésions dues à l'infection par le virus de la FA, les titres de virus dans les tissus affectés ont déjà considérablement diminué, tandis que les lésions guérissent rapidement et que la plupart des animaux ont déjà mis en place une réponse immunitaire. Les animaux guéris d'une infection ou vaccinés peuvent être diagnostiqués par la détection d'anticorps contre le virus de la FA en laboratoire.

Les animaux infectés produisent des anticorps contre les protéines structurales (PS) et non structurales (PNS) du virus. Pour une détection rapide et fiable des anticorps anti-SP, induits par l'infection ou la vaccination, le test ELISA sérotype spécifique est le plus souvent utilisé. Il est adapté aux sérums de différentes espèces animales. Les résultats de SPELISA sont confirmés par le test de neutralisation du virus (VNT) pour démontrer la présence d'anticorps anti-PS neutralisants. Bien que des réactions croisées soient parfois observées entre les différents sérotypes de virus de la FA, le test VNT reste plus spécifique que les ELISA anti-PS.

Les méthodes sérologiques traditionnelles visant à indiquer quelles souches vaccinales peuvent être efficaces contre la souche identifiée sur le terrain, appelées « concordance vaccinale » (*vaccine matching* en anglais), reposent sur la comparaison des titres d'un sérum vaccinal de référence vis-à-vis de la souche vaccinale et du virus de terrain. Cette comparaison peut être effectuée dans un format ELISA de détection des anticorps ou dans un format VNT.

2. Développement / Amélioration d'outils diagnostic

2.1 Développement d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse

A mon arrivée en juin 2009, il m'a été proposé de participer au « Développement d'un test sérologique multiplex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse » dans le cadre du Projet européen du 7^{ème} PCRD « DISCONVAC » (WP5, Task 3), initié en avril 2009 pour une durée de 36 mois. Notre équipe avait pour objectif, dans le cadre de ce projet, le développement d'un test de diagnostic sérologique rapide de l'infection par le FMDV, basé sur la technologie Luminex et permettant en une seule réaction la détection simultanée d'anticorps dirigés contre différents antigènes viraux et ce dans un très petit volume de sérum (1µl). Ce test devait permettre l'identification d'une infection à FMDV et également la distinction entre animaux infectés et animaux vaccinés.

La Technologie Luminex™ Xmap (Multi-Analyte Profiling), fondée sur le principe de la cytométrie en flux, allie l'utilisation de microbilles de polystyrène fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers (rouge et vert). Un panel de 100 billes renfermant un ratio différent de fluorescence rouge et orange est utilisable. Chaque bille, excitée par le laser rouge, a ainsi son propre code couleur d'identification permettant de l'identifier et analyser plusieurs molécules simultanément dans un même échantillon (MULTIPLEX). Ces différentes billes peuvent être couplées à leur surface avec des sondes oligonucléotidiques, des antigènes purifiés ou des anticorps de capture, permettant ainsi la détection d'allèles, d'anticorps ou des antigènes. Pour notre application, chaque type de bille était couplée à un antigène différent puis les différents complexes bille-antigène étaient mélangés dans un seul tube réactionnel. Après incubation avec le sérum à tester et un anticorps anti-espèce fluorescent, les billes ont été analysées au moyen d'un lecteur Luminex. Ce système permet d'une part l'identification des différentes billes (et donc des différents antigènes couplés), par leur fluorescence intrinsèque et d'autre part la détermination du type d'anticorps sériques par leurs réactions avec l'antigène couplé et le conjugué. La **Figure 21** représente le principe du test que nous proposons de développer.

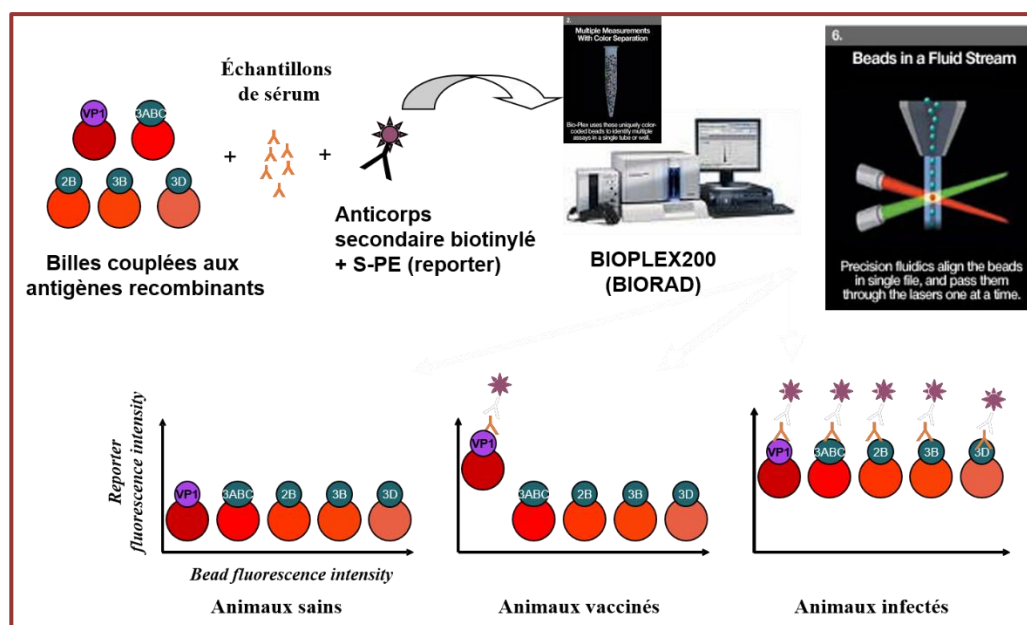


Figure 21 : Principe de l'immunoessai pour le diagnostic sérologique de la FA

La mise au point de ce test a nécessité de disposer des antigènes d'intérêt et de définir les conditions optimales pour les coupler sur les billes fluorescentes. Les antigènes d'intérêt sont les protéines structurales VP1 du FMDV de chaque sérotype, les protéines non structurales 3ABC, 3A, 3B, 3D et le peptide 2B du FMDV ainsi que des protéines de virus responsables de maladies vésiculeuses en vue du diagnostic différentiel de la FA.

Il était prévu initialement que ces protéines recombinantes, taguées à l'histidine, soient produites en système procaryote (*E. coli*) ou en cellules d'insecte (système baculovirus). Ces protéines ont été produites en *E. coli* au laboratoire (pour les VP1), en prestation dans le cadre du projet (3D) ou fournies par un partenaire (3ABC). Tout d'abord, une étude préliminaire a été initiée en juillet 2009 afin d'étudier la faisabilité et les conditions de préparation des protéines et de leur couplage aux billes. En parallèle, Je me suis impliquée dans l'acquisition d'une plateforme Luminex (Bioplex200), installée début 2011 au laboratoire. Les travaux pour mettre au point ce test multiplex ont été réalisés notamment avec l'aide d'une étudiante en Master 2 (Emilye Leboucher), 4 étudiants en BTS et une technicienne, Annabelle Garnier, ce qui était nécessaire pour ce projet ambitieux et complexe. Différents prototypes de test ont été développés et évalués sur des panels de sérums bovins, du simplex au 5-plex. Les résultats obtenus ont fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées et sont résumés en **Figure 22**.

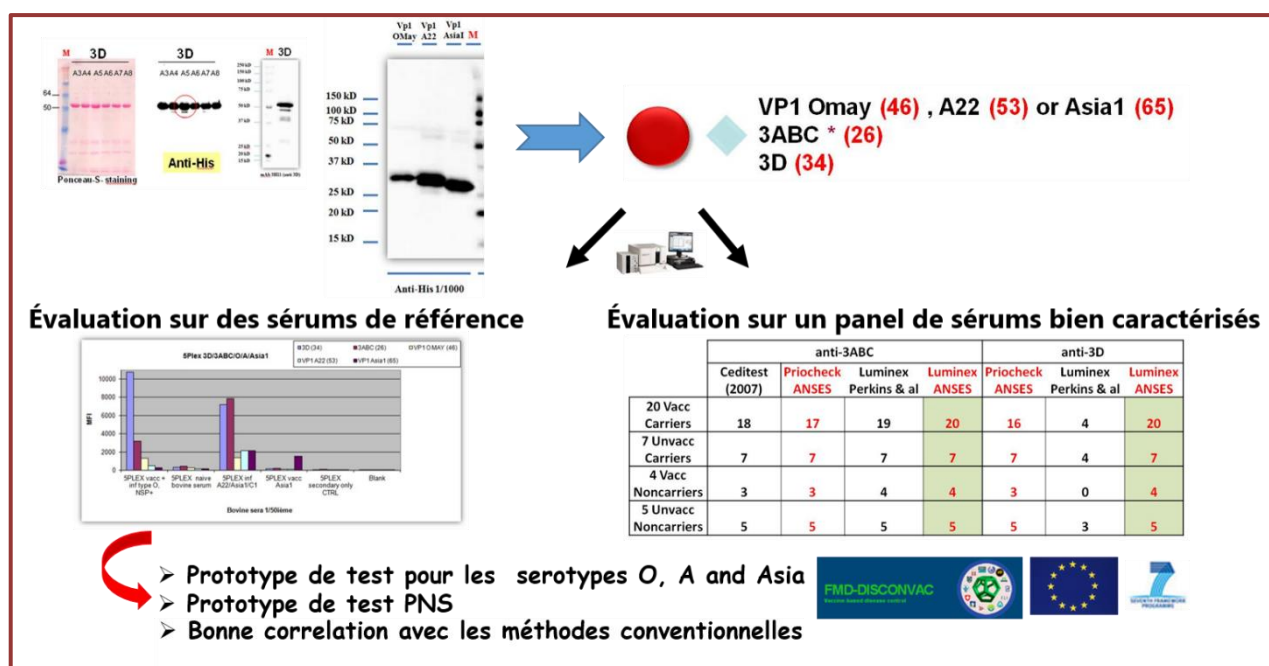


Figure 22 : Développement et évaluation d'un test immunologique multiplex basé sur la technologie Luminex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse

Les protocoles que nous avons développés pour le luminex en matière de diagnostic sérologique de la fièvre aphteuse et les problèmes rencontrés ont permis d'aider au développement de test sérologiques analogues pour la FCO (Fièvre catarrhale ovine) et les maladies équine auquel j'ai collaboré, valorisés par les publications dont je suis co-auteure (29,30).

2.2 Développement d'un test unique multiplex pour la détection et le typage moléculaire du virus de la Fièvre Aphteuse, en multiplex

Dans le cadre du WP5 "détection" du projet AniBioThreat (2010-2013) pour lequel le LSA n'était partenaire pour différents pathogènes qualifiés d'agents « d'agrobioterrorisme », comme B. Anthracis ou C. Botulinum, nous avons pour objectif le « Développement d'un test unique pour la détection et le typage moléculaire du virus de la Fièvre Aphteuse », en multiplex, en utilisant la technologie Luminex et la méthode des amplicons doublement marqués (**Figure 23**).

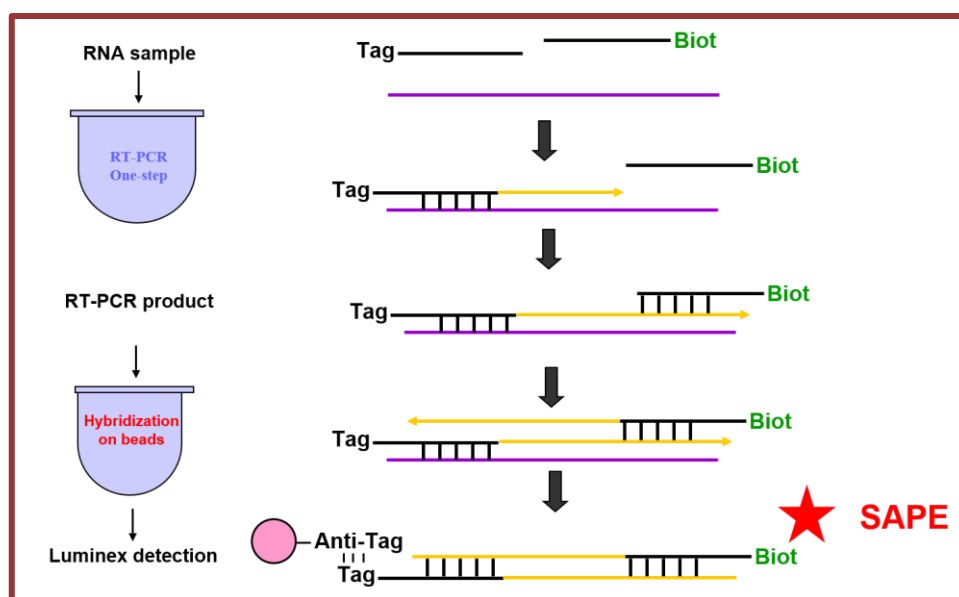


Figure 23 : Méthode de l'amplicon doublement marqué pour hybridation ultérieure sur billes magnétiques luminex

Ces travaux ont été réalisés par une chargée de projet post-doctorante Aude Allemandou recrutée (24 mois) sur ce projet. Un prototype de test 6-plex a été développé permettant la détection, le typage des virus de la FA, et permettant de différencier la FA de la maladie vésiculeuse du porc (MVP, causée par un autre Picornavirus), ceci en une seule réaction. Les amorces ciblant la région très conservée du génome codant pour la polymérase 3D du virus de la FA ont permis, comme attendu, de détecter spécifiquement toutes les souches de référence ainsi que les souches provenant d'échantillons de terrain. Les amorces spécifiques, ciblant la région génomique codant pour la VP1 des sérotypes A, O et Asia 1 ont donné un signal spécifique pour chaque sérotype avec les souches de référence testées ainsi qu'avec des échantillons de terrain. En outre, les amorces MVP permettaient de détecter spécifiquement les souches de référence MVP testées. Ce prototype de test permet de différencier le virus de la MVP du virus de la FA, et de réaliser le typage moléculaire des sérotypes O, A et Asia 1 du virus de la FA en un seul test. Par la suite, des amorces pour permettre le typage moléculaire des souches SAT ont été développées ainsi que des amorces pour la détection du virus de la stomatite vésiculeuse. Les résultats ont été présentés oralement ou sous forme d'affiches lors de congrès nationaux ou internationaux. La valorisation des résultats sous forme de publication a été initiée mais hélas non poursuivie suite au départ d'Aude Allemandou (raisons personnelles non compatibles avec ce travail de rédaction et hélas pas le temps ni les ressources nécessaires pour reprendre). La **Figure 24** synthétise les principaux résultats obtenus.

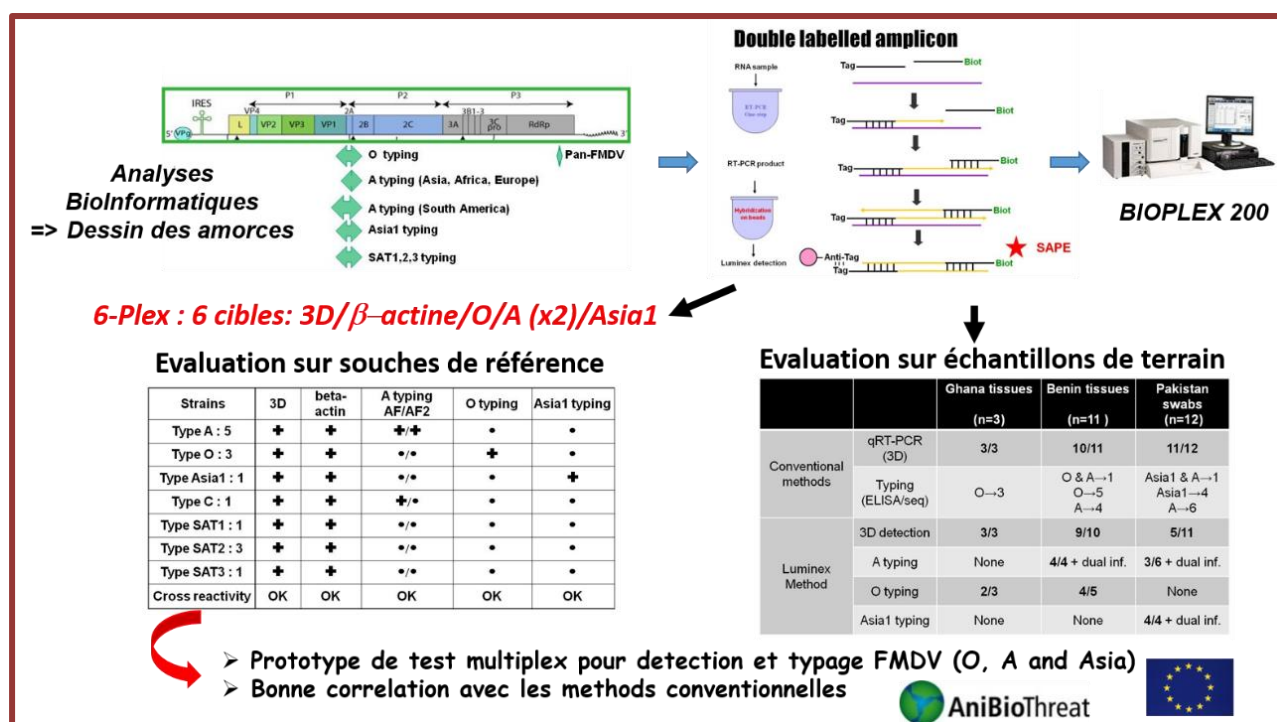


Figure 24 : Développement et évaluation d'un test multiplex basé sur la technologie Luminex pour le diagnostic de la fièvre aphteuse (détection et typage moléculaire)

2.3 Développement et validation de deux méthodes de rtRT-PCR pour la détection du virus de la fièvre aphteuse en une seule étape, en duplex ou triplex

Toujours dans le but d'améliorer la détection moléculaire du virus de la fièvre aphteuse, j'ai participé au développement et la validation par l'équipe de deux méthodes de rtRT-PCR pour la détection du FMDV.

La première méthode est une rtRT-PCR duplex en une étape avec un contrôle interne, développée par Kamila Gorna (technicienne), validée et publiée. Deux tests ont été ainsi établis et conçus comme un mélange réactionnel prêt à l'emploi pour la détection simultanée des cibles 3D ou IRES du FMDV et de l'ARNm du gène β -actine de l'hôte comme cible de contrôle interne. Cette méthode duplex est utilisée pour le diagnostic moléculaire de la FA et est une méthode accréditée par le COFRAC.

La deuxième méthode est une rtRT-PCR triplex en une étape permettant la détection simultanée des régions génomiques codant pour la polymérase 3D, la protéine non structurale 2B du FMDV et le gène cellulaire GAPDH. Cette méthode a été développée dans le cadre du programme LRUE FA, par Cindy Bernelin Cottet (Chargée de projet LRUE FA). Sa validation est en cours avec pour objectif d'en faire une méthode accréditée.

Activités de Référence FA LNR / LR OMSA	Travaux publiés dans <i>Journal of Virological Methods</i> (16)
---	---

2.4 Développement et Evaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le sérotypage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest

Nous avons également développé, Kamila Gorna et moi-même, une RT-PCR conventionnelle 6-plex en une étape pour la détection et la différenciation simultanées des sérotypes O, A, SAT1 et SAT2 du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest, directement à partir d'échantillons cliniques. Le développement de cette méthode a notamment bénéficié des amorces dessinées par Aude Allemandou (dans le cadre du projet AniBiothreat décrit plus haut) pour cibler les sérotypes SAT1 et SAT2. Un prototype de test 6-plex ciblant la région génomique 3D codant pour la polymérase du virus aphteux (pan-détection) ainsi que la région 1D codant pour la VP1 des types O, A, SAT1 et SAT2 (typage des virus du pool 5) a été développé. Les amorces ont été dessinées de façon à obtenir des profils d'amplification facilement interprétables visuellement par électrophorèse sur gel d'agarose. Des amorces ciblant le gène de la β -actine cellulaire sont également incorporées dans le test comme contrôle interne. Ce test a été évalué sur un panel d'échantillons de terrain issu du Nigeria et du Bénin (**Figure 25**). Dans le cadre du projet FMDV-WA (2017-2018) pour lequel j'ai obtenu

un financement du Ministère de l'agriculture (MAAF), nous avons établi une collaboration avec le Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires (LNERV) de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA). L'objectif de ce projet était qu'un scientifique du laboratoire partenaire ISRA – LNERV vienne au LSAN pour une période de 3 semaines afin de se former et de participer à la validation du prototype RT-PCR multiplex en analysant des prélèvements de terrain (Sénégal). Du 13 au 30 avril 2018, nous avons donc accueilli au laboratoire Gaye Laye Diop, ingénieure du LNERV et rapatrié les 77 échantillons de terrain qu'elle avait collectés sur le terrain au Sénégal. En plus de l'évaluation du prototype de 6-plex sur ces échantillons, nous avons également dispensé à Gaye Laye une formation aux techniques de diagnostic de la fièvre aphteuse. Cette collaboration avait également pour but de renforcer les capacités de diagnostic du LNERV en matière de fièvre aphteuse, avec pour objectif de pouvoir mettre en place des mesures de lutte efficaces ciblant les sérotypes et sous-types circulant dans la région d'intérêt et qui présentent une menace pour les pays d'Afrique du Nord et donc de l'Europe. Depuis son développement cette méthode a été évaluée sur des échantillons provenant de différents pays L'ensemble des résultats relatifs à cette méthode, de son développement à son évaluation sur échantillons de terrain ont été synthétisés pour publication (Romey, Gorna et al ; manuscrit en rédaction).

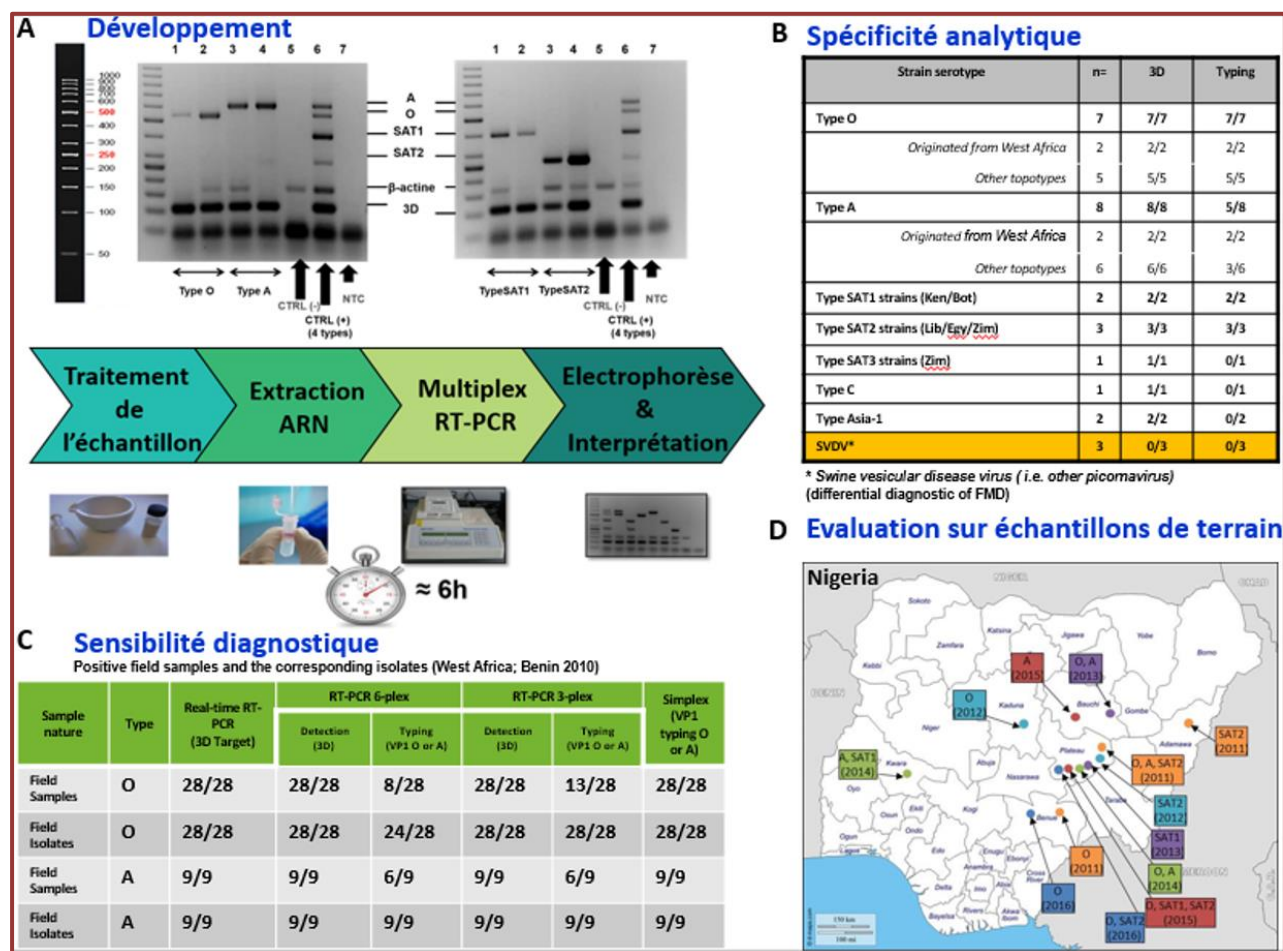


Figure 25 : Développement et évaluation d'une RT-PCR conventionnelle multiplex pour la détection et le typage simultanés du virus de la fièvre aphteuse circulant en Afrique de l'Ouest. A : étapes du test et visualisation/interprétation des résultats B : spécificité analytique C : sensibilité diagnostique (spécificité diagnostique établie sur 24 échantillons d'épithélium négatifs issus d'animaux français (bovins, porcs, ovins, caprins))

2.5 Développement d'une plateforme mobile de séquençage

Notre équipe est également impliquée dans le Projet ANR « PrepMedVet » (2020-2023), "Preparedness and Response in an Emergency context to Pathogens of MEDical and VETerinary importance". Dans le cadre de ce projet Franco-Allemand co-coordonné par le LSAN (Stéphane Zientara) et le FLI (Anne Pohlmann) notre équipe ainsi que l'équipe BIOR (biologie des orbivirus) est impliquée dans le développement d'une plateforme mobile de séquençage. Cette partie du projet est prise en charge par Mathilde Gondard, post-doctorante (CDD 22 mois, début de contrat 2 novembre 2022) au sein de nos 2 équipes. Mathilde a mis au point un protocole

de séquençage complet du génome FMDV basé sur la technologie MinION et a obtenu des résultats prometteurs présentés lors des JSDA 2022 (communication orale). Cette méthode est en cours d'évaluation sur des collections d'échantillons de terrain disponibles au laboratoire et/ou dans le cadre de collaborations. Ce projet bénéficie depuis juillet 2022 de l'aide de collaboratrices de la CIBU de l'Institut Pasteur Valérie Caro et Charlotte Balière pour optimiser les protocoles et partager leur expérience. Sur ce projet de séquençage et analyse bioinformatique, j'ai passé la main depuis janvier 2023 à mon collègue Guillaume Girault, chercheur ayant rejoint notre équipe en décembre 2022 et en charge des projets de séquençage (Sanger et NGS), d'épidémiologie moléculaire, phylogénie et database de séquences des virus de la fièvre aphteuse.

2.6 Du terrain au laboratoire : Promouvoir la soumission d'échantillons suspects de fièvre aphteuse aux laboratoires de référence

Une étape essentielle vers le contrôle et l'éradication de la fièvre aphteuse à l'échelle mondiale est l'identification des souches virales en circulation dans les régions endémiques afin de mettre en œuvre des mesures adéquates de contrôle des épidémies. Cependant, en raison du risque biologique élevé et de la nécessité d'expédier des échantillons biologiques congelés, le coût de l'expédition des échantillons devient l'un des principaux obstacles à la soumission d'échantillons suspects aux laboratoires de référence pour l'identification du virus.

Pour surmonter ces difficultés, nous avons mis au point une méthode rentable et sûre pour l'expédition des échantillons de fièvre aphteuse, dans le cadre du projet FMDVINACT soutenu par la Commission européenne pour la lutte contre la fièvre aphteuse, EuFMD (FAR 2013-2015 « Use of Lateral Flow Device for safe and low cost shipment of FMDV suspected samples). La méthode est basée sur l'inactivation du virus de la fièvre aphteuse (FMDV) sur bandelette de test LFD « lateral Flow Disease » (LFD, test couramment utilisé sur le terrain pour l'immunodétection rapide du FMDV), permettant sa détection et son typage ultérieurs par RT-PCR et la récupération du virus vivant après transfection de l'ARN dans des cellules permissives. Le protocole a été validé en laboratoire en utilisant des cultures de cellules infectées et des échantillons d'épithélium de la collection du laboratoire, et publié.

Afin d'évaluer ce protocole sur le terrain, j'ai écrit, en collaboration avec des laboratoires de pays endémiques (Turquie, Nigeria et Pakistan), le projet « Rapid, on site, diagnosis of FMD and safe and cost-effective shipment of samples using lateral flow devices for laboratory diagnostic (LFD_FIELD_EVAL_INACT) qui a été financé par l'EuFMD FAR 2017, avec le soutien de la division santé publique vétérinaire Boehringer Ingelheim. Les résultats de ce projet, que j'ai coordonné, ont fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées et d'une publication. Ils confirment la biosécurité du protocole d'inactivation virale basé sur l'inactivation du virus déposé sur bandelettes LFD. Ce protocole permet la détection et le typage du génome du virus de la fièvre aphteuse par (rt)RT-PCR et la caractérisation complète des souches en cause a pu être réalisée pour certains échantillons, à partir du virus vivant récupéré par transfection de l'ARN en cellules caprines (**Figure 26**).

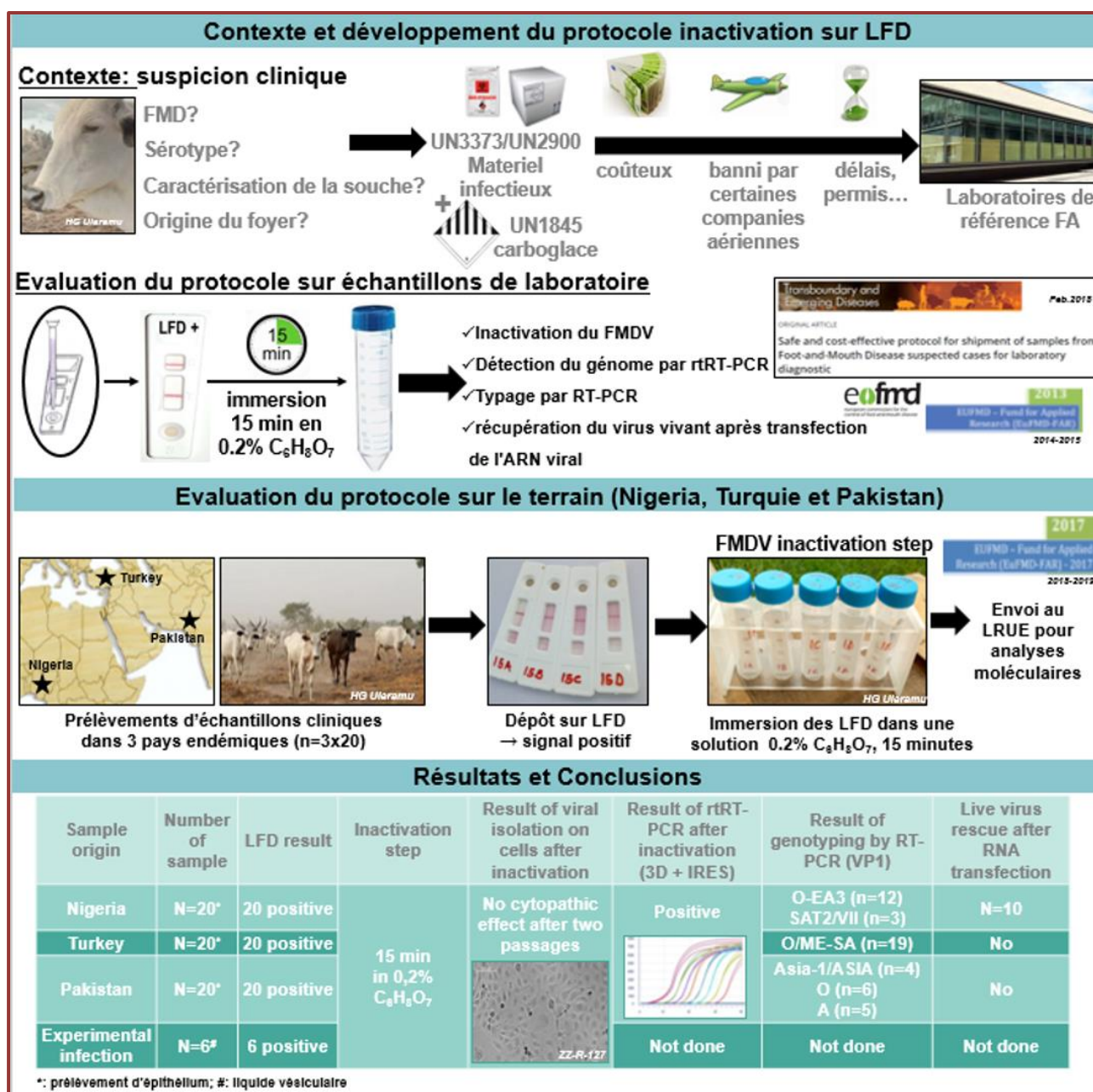


Figure 26 : Évaluation sur le terrain d'un protocole sûr et peu coûteux, basé sur l'inactivation virale sur test rapide LFD, pour l'envoi d'échantillons suspects de fièvre aphteuse aux laboratoires de diagnostic

Ce protocole a également été approuvé par le comité de biorisque de l'EuFMD le 6 octobre 2021, comme méthode permettant de promouvoir la soumission d'échantillons suspects de fièvre aphteuse aux laboratoires de référence. Tout ce travail a été mené avec ma collègue assistante ingénieure Aurore Romey qui a assuré la partie technique du projet mais également la valorisation de ces résultats. Aurore prépare un doctorat par VAE pour 2023-2024 et j'aurai le plaisir d'être son encadrante pour cette étape.

Projet FMDVINACT	Travaux publiés dans <i>Transboundary and Emerging Diseases</i> (14)
Projet LFD_FIELD_EVAL_INACT	Travaux publiés dans <i>Transboundary and Emerging Diseases</i> (2)

3. Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse

3.1 Premier isolement viral et caractérisation moléculaire du virus de la fièvre aphteuse au Bénin

Peu après mon arrivée dans l'équipe Biopic, il m'a été proposé de participer au co-encadrement d'une doctorante, d'origine béninoise, Evelyne Houndje, qui avait initié une thèse à l'institut de médecine tropicale d'Anvers. En Afrique de l'Ouest, où l'on suppose une circulation constante du virus de la fièvre aphteuse (FMDV), très peu d'études sur la caractérisation des souches circulantes ont été publiées. Déterminer les souches circulantes en zone d'endémie contribue pourtant à une meilleure sélection des souches vaccinales. Evelyne a réalisé une campagne de prélèvements de terrain, au Bénin, dans des fermes ou des marchés. Nous avons reçu ces échantillons au laboratoire et avons accueilli Evelyne au printemps 2012 pour une formation de 5 semaines aux techniques de diagnostic sérologique et virologique de la fièvre aphteuse à partir de ses 42 échantillons de terrain. Cette étude décrit le premier isolement et la première caractérisation du virus de la fièvre aphteuse au Bénin. L'Elisa de capture d'antigène (Ag-ELISA) et l'analyse de la séquence codante VP1 ont révélé 33 souches de sérotype O et 9 souches de sérotype A. L'analyse phylogénétique de la séquence VP1 a révélé deux groupes différents d'isolats de type O et un groupe d'isolats de type A. La comparaison de la séquence VP1 avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank a révélé une relation étroite des isolats du Bénin avec le topotype O de l'Afrique de l'Ouest et avec le topotype A africain du génotype VI. Ces travaux ont fait l'objet d'un article de synthèse bibliographique en français et d'une publication. Evelyne est ensuite retournée au Bénin et a soutenu sa thèse en novembre 2017, incluant cette étude épidémiologique.

Projet doctoral d'Evelyne Houndje	Travaux publiés dans <i>Veterinary Medicine and Science</i> (11)
--	--

3.2 Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse au Tchad

En matière d'épidémiologie moléculaire de la FA, j'ai également participé à l'encadrement de ABDEL-AZIZ Arada Izzedine, dans le cadre de sa thèse intitulée « Epidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse en Afrique Subsaharienne: cas du Tchad » menée en collaboration avec le CIRAD (thèse Anses/CIRAD 2016-2018) et le Laboratoire de recherches vétérinaires et zootechniques de Farcha au Tchad. Cette étude visait à déterminer la séroprévalence de la fièvre aphteuse chez les ruminants domestiques et à caractériser les souches virales circulant dans quatre régions du Tchad (Batha Est, Batha Ouest, Wadi Fira et Ennedi Ouest), en zone pastorale. Au total, 1 520 échantillons de sérums (928 bovins, 216 caprins, 254 ovins et 122 dromadaires) ont été collectés de manière aléatoire pour les analyses sérologiques de la fièvre aphteuse d'octobre à novembre 2016. Neuf échantillons de tissus épithéliaux ont également été prélevés sur des bovins présentant des signes cliniques, afin d'isoler et de caractériser le virus de la fièvre aphteuse.

Nous avons accueilli Arada au laboratoire et l'avons formé aux techniques de diagnostic de la fièvre aphteuse en parallèle de l'analyse de ses échantillons. Les résultats sérologiques ont montré une séroprévalence globale de 40 %. Il a été constaté que les séroprévalences élevées ont été obtenues dans les zones où les pâturages sont partagés par plusieurs troupeaux différents, mais aussi dans les fermes où deux à trois espèces (bovins, caprins et ovins) sont élevées ensemble. Les résultats du sérotypage par ELISA PrioCHECK®FMDV types O et A et par ELISA de compétition en phase solide interne ont montré que les quatre sérotypes O, A, SAT1 et SAT2 ont circulé au Tchad en 2016. Cependant, le type SAT2 a dominé avec une séroprévalence globale de 43% (29/67) et était présent dans les quatre zones étudiées. Les analyses phylogénétiques de la séquence codante VP1 ont permis de déterminer le topotype VII du sérotype SAT2, proche des souches virales trouvées au Cameroun en 2015 avec une similarité de 98,60%. Ces travaux ont été présentés lors des JSDA 2017 et au congrès Epizone 2017 et ont fait l'objet d'une publication.

Projet doctoral Anses/CIRAD d'ABDEL-AZIZ Arada Izzedine	Travaux publiés dans <i>Veterinary Microbiology</i> (20)
--	--

3.3 Reconstruction phylodynamique de l'histoire du topotype O/EA-3 du virus de la fièvre aphteuse en Afrique

Suite à la propagation épidémique la lignée O/EA-3 du virus de la fièvre aphteuse qui a touché l'Afrique de l'Ouest puis le Maghreb entre 2017 et 2018, une étude descriptive de l'épidémiologie de cette souche a été réalisée, en collaboration avec l'unité d'épidémiologie du LSA en collaboration avec des partenaires

européens. Cette étude, menée par Souheyla Benfrid, chargée de projets LRUE-FA (2019-2022) a permis de tracer les voies de propagation possible de cette lignée entre l'Est, Ouest, Centre et Nord Afrique. J'ai participé à cette étude et à la valorisation de ces résultats sous forme d'une publication.

Activités de Référence FA OMSA/FAO	Travaux publiés dans <i>Transboundary and emerging diseases</i> (6)
---	---

4. Stratégies vaccinales anti fièvre aphteuse

4.1 Virus recombinant chimère EMCV-FMDV pouvant être utilisé comme vaccin vivant, atténué et marqueur contre la fièvre aphteuse

A mon arrivée en BIOPIIC en juin 2009, j'ai participé à l'encadrement du projet de thèse de Margot Carocci, inscrit dans le projet DISCONVAC et portant sur la mise au point d'un vaccin marqueur contre la fièvre aphteuse. Ces travaux de recherche fondamentale, valorisés par une publication, ont permis de mettre en évidence des propriétés virologiques importantes pour la protéine 2A de l'EMCV, picornavirus qui sur de nombreux aspects est assez proche du FMDV. Margot a en effet démontré que la protéine 2A de l'EMCV est nécessaire à l'inhibition de l'apoptose pendant l'infection par l'EMCV et importante pour que le virus puisse contrer les défenses de l'hôte *in vitro*.

Projet DISCONVAC WP4	Travaux publiés dans <i>Journal of Virology</i> (21)
-----------------------------	--

4.2 Signatures transcriptomiques et prédiction de l'efficacité de la réponse vaccinale

Par la suite, dans le cadre du projet Transcriptovac (projet au sein duquel j'étais particulièrement impliquée dans le WP2 et les modèles d'infection persistante), notre équipe BIOPIIC, en partenariat avec l'INRAe, Sciensano et l'équipe THAI de l'UMR virologie, a collaboré à une étude chez l'ovin, sur les signatures transcriptomiques pour la mise en évidence de biomarqueurs sanguins candidats permettant de prédire l'efficacité de la réponse vaccinale.

Projet TRANSCRIPTOVAC WP1	Travaux publiés dans <i>NPJ Vaccines</i> (9)
----------------------------------	--

4.3 Projet SPIDAC : Nouveaux vaccins contre la fièvre aphteuse et tests diagnostiques compagnons

Dans le cadre du projet SPIDVAC (HORIZON-CL6-2021-FARM2FORK-01-06) intitulé «Improved control of priority animal diseases: Novel vaccines and companion diagnostic tests for African horse sickness, peste des petits ruminants and foot-and-mouth disease» co-coordonné par le FLI et le LSA et impliquant 13 partenaires internationaux. Ce projet a démarré le 1er juillet 2022 pour 42 mois. Ce projet a pour but de développer des vaccins innovants et des tests de diagnostic compagnons pour trois maladies animales prioritaires figurant sur la liste des maladies terrestres à déclaration obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) : la peste équine (AHS), la peste des petits ruminants (PPR) et la fièvre aphteuse (FA).

Je pilote les activités de recherche concernant la fièvre aphteuse avec une ingénieure recrutée sur le projet le 1er septembre dernier (Philippine Toneatti) et avec le soutien de l'équipe Biopic et plus particulièrement d'Anthony Relmy.

Pour l'instant notre équipe a essentiellement commencé les activités du WP3 concernant le développement d'un test Elisa compagnon basé sur la détection d'anticorps dirigés contre la protéine non structurale 2B. Je détaillerai les autres tâches du projet, en lien avec le FMDV, en partie II « programme de recherche » de ce manuscrit.

5. Interactions FMDV/hôte et mécanismes de persistance du FMDV

Après avoir pris mes marques dans l'équipe BIOPIIC, m'être familiarisée avec la thématique fièvre aphteuse (FA), les activités de diagnostic et de référence et avoir suivi le cours Pasteur de virologie fondamentale fin 2010, j'ai entrepris de m'intéresser aux interactions établies entre le virus de la FA et ses hôtes et à la persistance de ce virus en particulier. Comme indiqué en paragraphe 1.5, suite à l'infection par le virus de la FA (FMDV), plus de 50% des ruminants deviennent en effet infectés de façon persistante par des mécanismes restant non élucidés à ce jour. La **Figure 27** reprend les grandes lignes de la persistance du virus de la FA et les enjeux associés.



Figure 27 : Persistance du virus de la FA et enjeux associés *adapté du manuscrit de thèse de Morgan Sarry, 2023*

5.1 Déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse

J'ai déposé fin 2010 une demande de financement doctoral auprès de la direction scientifique et ai obtenu un financement de thèse intitulé "Déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse". Ce travail a été réalisé par Lela Kopliku de 2011 à 2014 (thèse soutenue le 17 octobre 2014, dirigée par Labib Bakkali Kassimi et encadrée par moi-même). Le premier objectif de ce projet de thèse était de développer un modèle in vitro d'infection persistante du virus de la FA, en utilisant des cellules bovines, les précédentes études ayant été conduites avec des cellules de hamster BHK-21 ou de porc IBRS-2 chez qui la persistance n'est pas décrite. Lela Kopliku a réussi à établir des cellules épithéliales bovines rénales MDBK infectées de façon persistante par un clone viral dérivé de la souche FMDV O/FRA/1/2001 (FMDV O CI 2.2), dans lesquelles (i) de l'ARN viral est détectable jusqu'à 38 passages après infection initiale (ce qui correspond à 5 mois de culture cellulaire depuis l'infection initiale des cellules MDBK par FMDV), et (ii) des protéines virales sont détectables par immunofluorescence jusqu'au passage 36. Ces cellules, nommées MDBKp, produisent également des particules infectieuses. Des études préliminaires ont été réalisées sur les virus FMDV « persistants » du passage 23 (**Figure 28**). Des régions ciblées du génome du FMDVp23 ont été analysées, et le séquençage des autres régions a été réalisé sur le FMDVp23, mais aussi sur les FMDVp d'autres passages, dans le but de rechercher des mutations liées à l'infection persistante. Ce travail a été valorisé par une publication L'assemblage de la construction moléculaire permettant d'obtenir un système de génétique inverse du virus FMDV (FMDV O/FRA/1/2001 CI 2.2) a été initié par Lela, avec l'objectif d'utiliser cet outil pour étudier notamment l'effet des mutations du virus mises en évidence au cours de la persistance. Depuis la fin de thèse de Lela en 2014, l'outil de génétique inverse a été construit par notre partenaire au FLI, Michael Eschbaumer et son équipe dans le cadre du projet FMDV_PersistOmics (2021-2024).

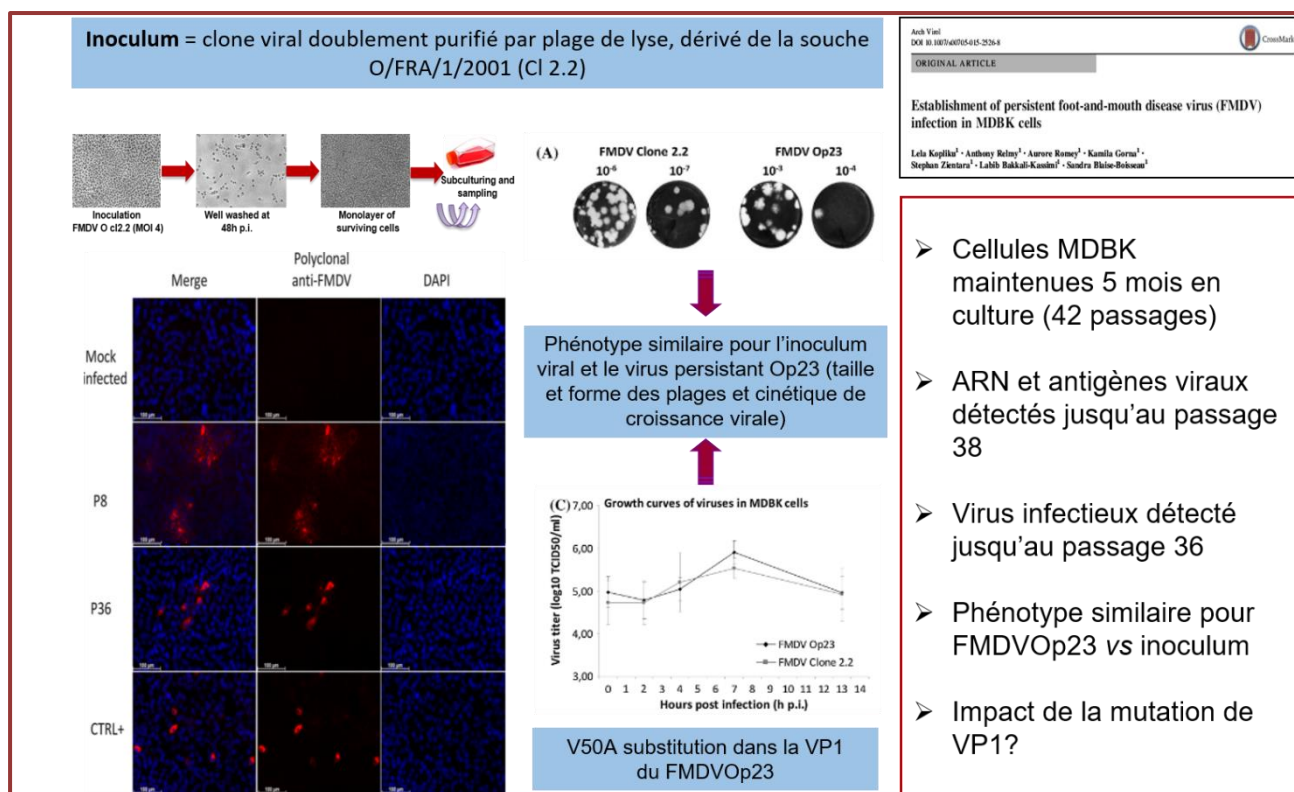


Figure 28 : Un premier modèle d'infection persistante par un FMDV de type O, en cellules épithéliales bovines MDBK Kopliku et al ; 2015 (31)

Projet doctoral Anses de Lela Kopliku	Travaux publiés dans <i>Archives of Virology</i> (18)
--	---

5.2 Modèle d'infection persistante de cellules épithéliales primaires de nasopharynx bovin par le virus de la fièvre aphteuse et analyse transcriptionnelle de la réponse de l'hôte

Dans le cadre du projet européen Transcriptovac (ANIHWA 2015-2019) coordonné par notre équipe, j'ai pu poursuivre cette thématique, en développant des modèles cellulaires plus pertinents dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien de l'infection persistante par le FMDV. Ce travail a bénéficié de l'arrivée dans l'équipe d'Eve Laloy, vétérinaire et maître de conférence ENVA, spécialisée en anatomopathologie et rattachée à notre équipe pour ses activités de recherche. Comme la persistance a lieu *in vivo* chez les bovins, dans les cellules épithéliales du palais mou dorsal (DSP), un modèle a été établi en collaboration avec Jean-François Valarcher et Sara Hägglund du SLU (Université suédoise des sciences agricoles) en infectant des cellules épithéliales primaires de palais mou dorsal (DSP) de bovins, cultivées soit en monocouches soit en multicouches à l'interface air-liquide (IAL).

Dans les travaux préliminaires réalisés sur monocouches de DSP, du virus infectieux a pu être détecté dans les surnageants de culture jusqu'à 149 jours après l'inoculation (d.p.i.) (fin de l'expérience). Des résultats de séquençage ciblant les protéines du FMDV connues pour moduler la réponse antivirale cellulaire (protéines Lpro, 2B, 2C, 3A, 3C, VP3 et VP1) ont mis en évidence des mutations dans la région du génome codant pour les protéines Lpro, 2C et VP3. L'impact de ces mutations sur la réponse antivirale cellulaire et leur rôle potentiel dans la persistance virale a été étudié en collaboration avec l'équipe I5 de l'UMR de virologie, par essais rapporteurs luciférase, avec l'aide d'une stagiaire BTS, Naomi Ledey. Ces travaux n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des mutations étudiées.

Une infection persistante par le FMDV jusqu'à 28 dpi (fin de l'expérience) a été ensuite établie dans des multicouches de DSP et ce modèle a été publié (**Figure 29**). Dans ce modèle, l'antigène, l'ARN et le virus vivant FA ont été détectés du 1er au 28e jour, avec des pics aux 1er et 2e jours. La proportion de cellules infectées était la plus élevée à 24 heures (3 % et 36 % des cellules à une MOI de 0,01 et 1, respectivement). Au 28e jour après l'infection, à un moment où les animaux qui hébergent encore le virus de la fièvre aphteuse sont considérés comme porteurs, l'antigène du virus de la fièvre aphteuse a été détecté dans 0,2 % à 2,1 % des cellules, dans toutes les couches, et un virus vivant a été isolé dans les surnageants de 6 cultures sur 8. Ce modèle de cultures primaires de DSP, à l'interface air-liquide de la DSP offre de nouvelles possibilités d'étudier

la persistance du virus de la fièvre aphteuse de manière contrôlée. Plus pertinent au regard des sites d'infection et persistance du virus in vivo chez le bovin, ce modèle permet une culture à long terme sans perturbation des cellules et reproduit les conditions in vivo, dans la mesure où les cellules du palais mou se développent en multicouches et sont en contact avec l'air. Ce modèle peut contribuer à limiter/épargner les études expérimentales utilisant des animaux de laboratoire. Il pourra permettre de développer des moyens d'interférer sur les mécanismes de persistance du virus de la fièvre aphteuse et d'améliorer le diagnostic.

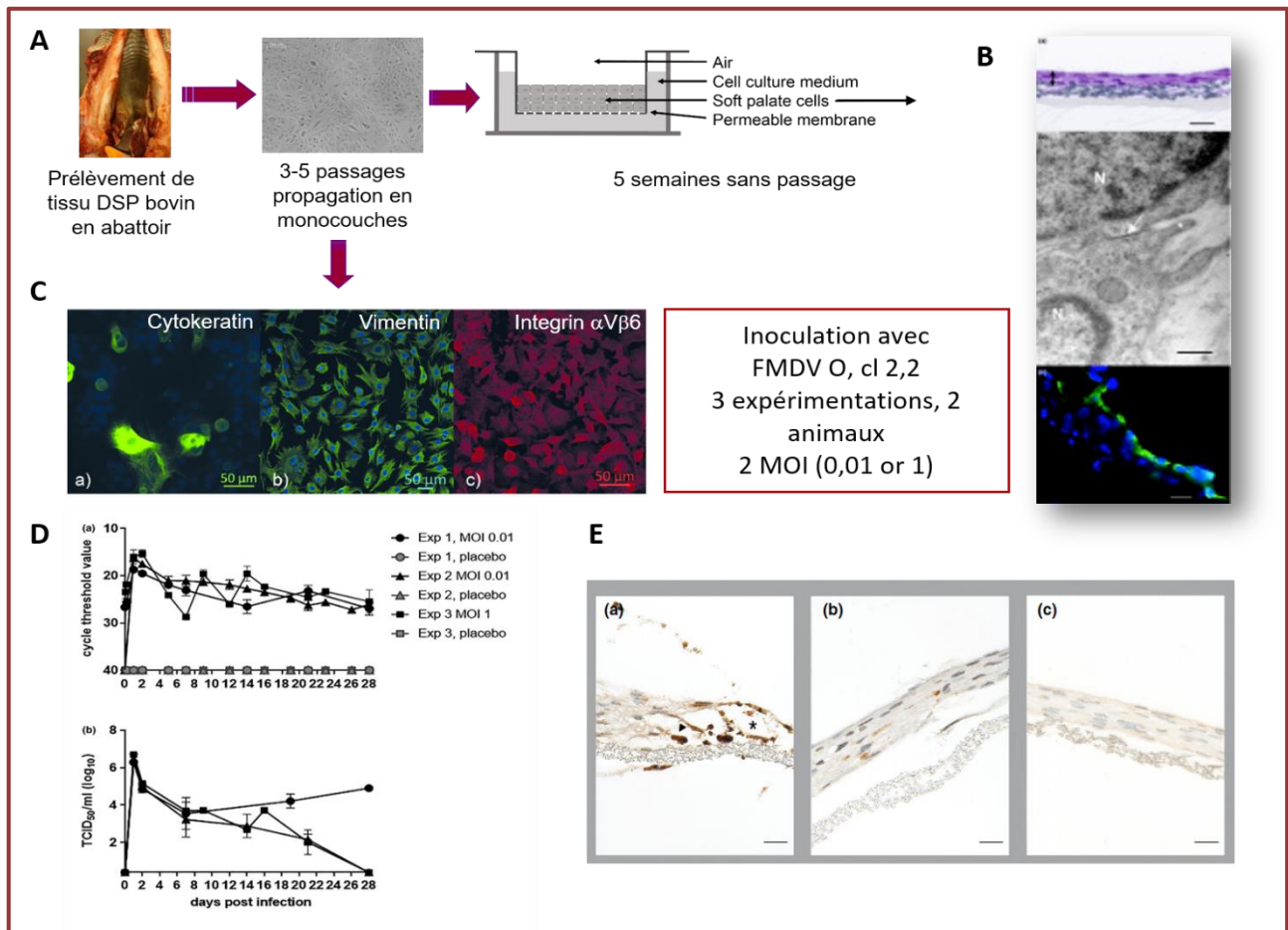


Figure 29 : Modèle d'infection persistante par le virus de la FA dans des cellules épithéliales bovines primaires dérivées de palais mou dorsal, cultivées en multicouches à l'interface air-liquide **A** : isolement de cellules épithéliales à partir de DSP prélevé en abattoir, propagation en monocouches puis ensemencement en système IAL pour établir des multicouches. **B** : caractérisation des multicouches de DSP-IAL a) Coupe transversale des multicouches (double flèche) reposant sur une membrane PTFE, visualisée par microscopie optique ; coloration HES ; barre = 20 μ m. b) Coupe transversale de la couche supérieure visualisée par microscopie électronique à transmission : jonction serrée (flèche) entre deux cellules ; (N : noyau) dans la couche supérieure ; l'une des cellules présente des microvillosités apicales (*) ; barre = 500 nm. c) Coupe transversale des multicouches après coloration de l'anticorps anti-cytokératine (vert) et visualisation au microscope Nikon eclipse Ts2R (barre = 50 μ m). **C** : Les cellules du palais mou dorsal bovin expriment la cytokératine, la vimentine et l'intégrine $\alpha V\beta 6$ après passage in vitro. Les cellules du palais mou dorsal bovin ont été isolées par digestion protéasique, filtration et élimination des cellules rapidement adhérentes. Après congélation, décongélation et trois à cinq passages dans des flacons, les cellules ont été propagées en monocouches sur des lames de chambre Lab-Tek et colorées avec des anticorps monoclonaux spécifiques de la cytokératine (vert a), de la vimentine (vert, b) ou de l'intégrine $\alpha V\beta 6$ (rouge, c) et des anticorps secondaires conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine ou à l'Alexa Fluor® 647. Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI (bleu, a et b) et les cellules ont été visualisées par microscopie confocale à balayage laser (ZEISS LSM700). **D** : L'ARN viral et le virus vivant de la fièvre aphteuse peuvent être récupérés à partir de cellules du palais mou dorsal bovin infectées de manière persistante et propagées in vitro. Après cinq semaines de culture, les membranes ont été infectées par le virus de la FA à une MOI 0,01 ou MOI 1, ou par un lysat cellulaire non infecté en guise de placebo. Les cellules ont été lavées tous les 2 à 3 jours pendant 28 jours post inoculation. Ces échantillons de lavage ont été analysés pour la présence de génome viral en ciblant la région codant pour la polymérase 3D par RT-qPCR (a) ou ont été dilués en série de raison 10 et inoculés sur des cultures IBRS-2 pour titration virale par la méthode des TCID₅₀. **E** : Expression de la polymérase 3D dans les multicouches du palais mou dorsal bovin après infection par la FA, détectée par immunohistochimie dans le cytoplasme des cellules après infection à une MOI de 1 à 24 hpi (a) et à 28 dpi (b), mais pas dans les multicouches de contrôle (c) Barre = 20 μ m Hägglund et al ; 2020 (32)

A partir de ce modèle in vitro, en collaboration avec le FLI (Friedrich Loeffler Institute, Allemagne), les profils d'expression génétiques différentiels entre les cellules DSP infectées de façon persistante et les cellules témoins non infectées ou infectées de façon aiguë (24hpi) ont été analysés par des approches

transcriptomiques et protéomiques (**Figure 30**). Au total, 312 et 73 transcrits de gènes ont été exprimés de manière différentielle à 24 hpi et 28 dpi, respectivement. Avec 305/312 (97,7 %) pour 24 hpi et 65/73 (89 %) pour 28 dpi, la majorité des transcrits différentiellement exprimés étaient régulés à la hausse, tandis que seuls 8/312 (2,5 %) et 8/73 (11 %) étaient régulés à la baisse. Sur un total de 324 transcrits différentiellement exprimés aux deux moments, 249 et 10 transcrits étaient uniquement régulés pendant la phase aiguë ou persistante, respectivement. L'expression de 63 transcrits était significativement régulée à la hausse pendant les deux phases de l'infection. Plus précisément, nous avons ainsi pu montrer dans ce modèle, que l'infection aiguë est caractérisée par une forte transcription des ISGs (interferon stimulated genes) conduisant à une forte activité antivirale. L'infection persistante s'accompagne, elle, d'une réponse antivirale innée durable (ISG encore exprimés) mais diminuée (pas d'interféron beta détectable) et inefficace pour éliminer le virus, contribuant vraisemblablement à l'équilibre maintenu entre présence du virus et réponse de la cellule hôte.

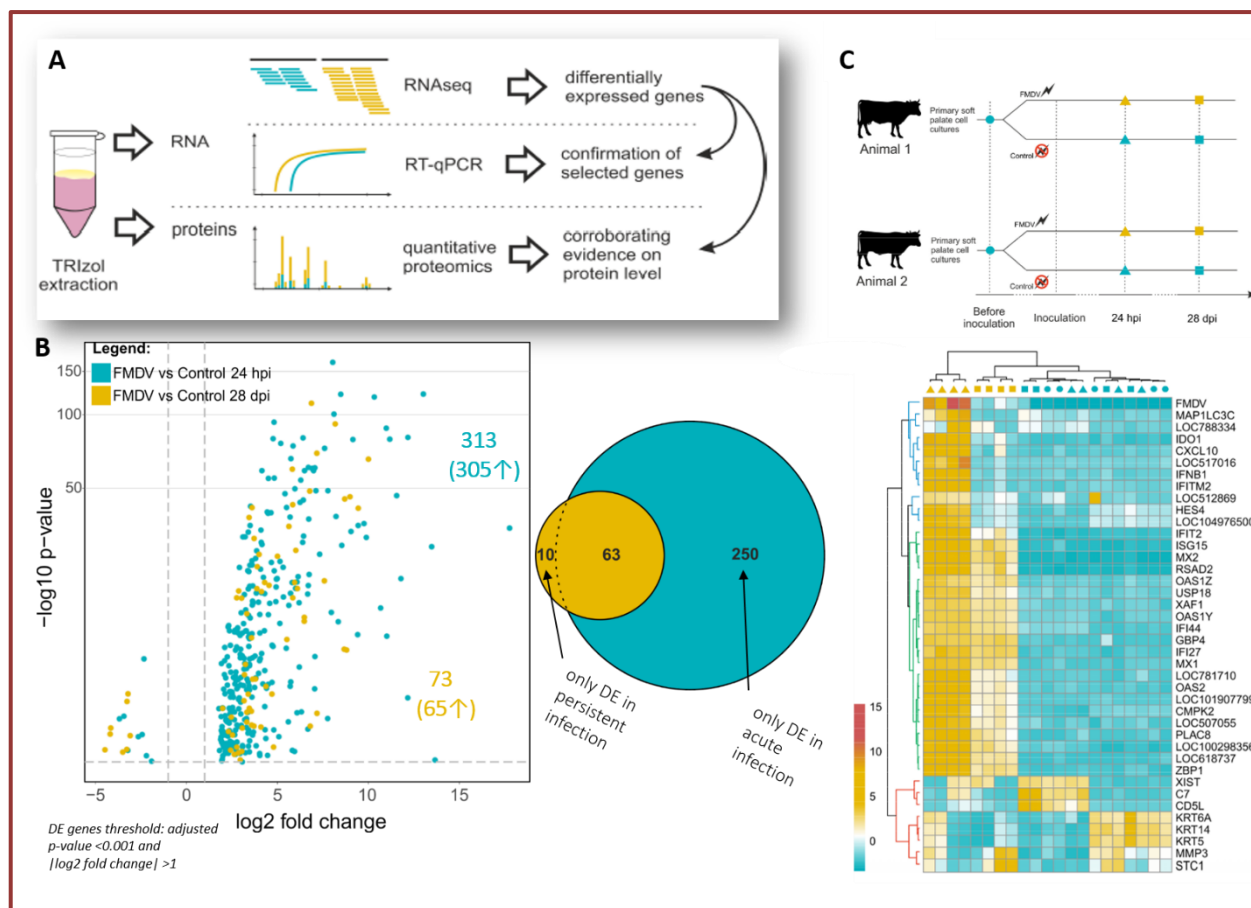


Figure 30 : Analyses transcriptomiques des cellules DSP cultivées en multicouches après infection par le virus de la FA (infection aiguë 24hpi vs infection persistante 28dpi) A : les cellules DSP-IAL ont été lysées en trizol aux temps indiqués pour extraction des ARN et protéines et analyses transcriptomiques et protéomiques. B : Expression génique différentielle des cellules SP pendant l'infection par le virus de la fièvre aphteuse. (A) Diagramme en volcan montrant le « log2foldchange » (axe des x) et la valeur p ajustée (axe des y) pour tous les gènes différentiellement exprimés pendant la phase aiguë (24 hpi, vert) et persistante (28 dpi, orange) de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse. Le nombre total de gènes différentiellement exprimés est visualisé dans un diagramme de Venn. Le chevauchement indique les 63 gènes qui différentiellement exprimés pendant les deux phases. C : La variance du nombre de gènes normalisés a été calculée pour chaque gène et les 45 gènes présentant la variance la plus élevée ont été sélectionnés et visualisés dans une carte thermique. La couleur des cellules indique la différence par rapport au nombre moyen de gènes normalisés du gène correspondant. Les échantillons et les gènes ont été regroupés en fonction de ces différences (arbres). Le groupe de transcrits mis en évidence en vert est activé de la même manière par l'infection aiguë et persistante par le virus de la fièvre aphteuse, tandis que le groupe bleu met en évidence les transcrits qui ne sont actifs que pendant la phase aiguë de l'infection. Le groupe rouge comprend des transcrits dont l'abondance diffère entre les animaux donneurs utilisés dans cette étude. *Pfaff et al ; 2019* (33)

Ces analyses ont également permis d'identifier des gènes candidats jouant un rôle important dans l'établissement/maintien de l'infection persistante par le virus de la fièvre aphteuse, i.e les 10 gènes uniquement régulés pendant l'infection persistante et listés dans la **Figure 31**. En étudiant cette liste, une inhibition multigénique de l'apoptose pourrait contribuer au maintien de la persistance virale. La persistance du virus de la FA dans ce modèle semble également s'accompagner d'une modification de la matrice extracellulaire.

Gene	Description	Log2 fold change	adjusted p-val	
▶ NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	-4,48	3,35E-04	
▶ ANKRD1	ankyrin repeat domain 1	-4,19	6,61E-05	
▶ SFRP2	secreted frizzled related protein 2	-4,16	3,31E-05	
▶ COL1A1	collagen type I alpha 1 chain	-3,50	4,16E-04	8↓
▶ COL3A1	collagen type III alpha 1 chain	-3,28	3,23E-04	
▶ MYLK	myosin light chain kinase	-3,26	9,61E-07	
▶ HTRA3	HtrA serine peptidase 3	-3,21	2,93E-07	
▶ ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family member A2	-3,09	7,83E-05	
▶ LY6E	lymphocyte antigen 6 family member E	3,45	2,59E-06	2↑
▶ FBP1	fructose-bisphosphatase 1	4,09	2,94E-05	

Figure 31 : Gènes différentiellement exprimés uniquement pendant la phase persistante de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse dans le modèle DSP-IAL. Pointe de flèche noire : gènes en lien avec la matrice extracellulaire Pointe de flèche rouge : gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose **Pfaff et al ; 2019** (33)

Projet TRANSCRIPTOVAC WP3	Travaux publiés dans <i>Transboundary and Emerging Diseases</i> (10) et dans <i>Viruses</i> (12)
----------------------------------	--

5.3 Cartographie d'interactions entre les protéines du FMDV et les protéines bovines par crible double hybride en levure

Au sein du projet Transcriptovac toujours, en parallèle des travaux sur DSP bovines primaires, et afin de mieux comprendre les interactions entre le FMDV et l'hôte et leur modulation dans les infections persistantes, nous avons réalisé, dans le cadre du stage de M2 de Sophie Bach (2016, financé sur le projet Transcriptovac) une cartographie d'interactions entre les protéines du FMDV et les protéines bovines en utilisant le système de double hybride en levure. Ce projet a été réalisé en collaboration et avec le soutien de l'équipe I5 (Gregory Caignard et Damien Vitour). Comme présenté en **Figure 32**, ce criblage a identifié 313 interactions impliquant 18 protéines bovines, impliquées dans 3 voies de signalisation (immunité innée, apoptose et autophagie).

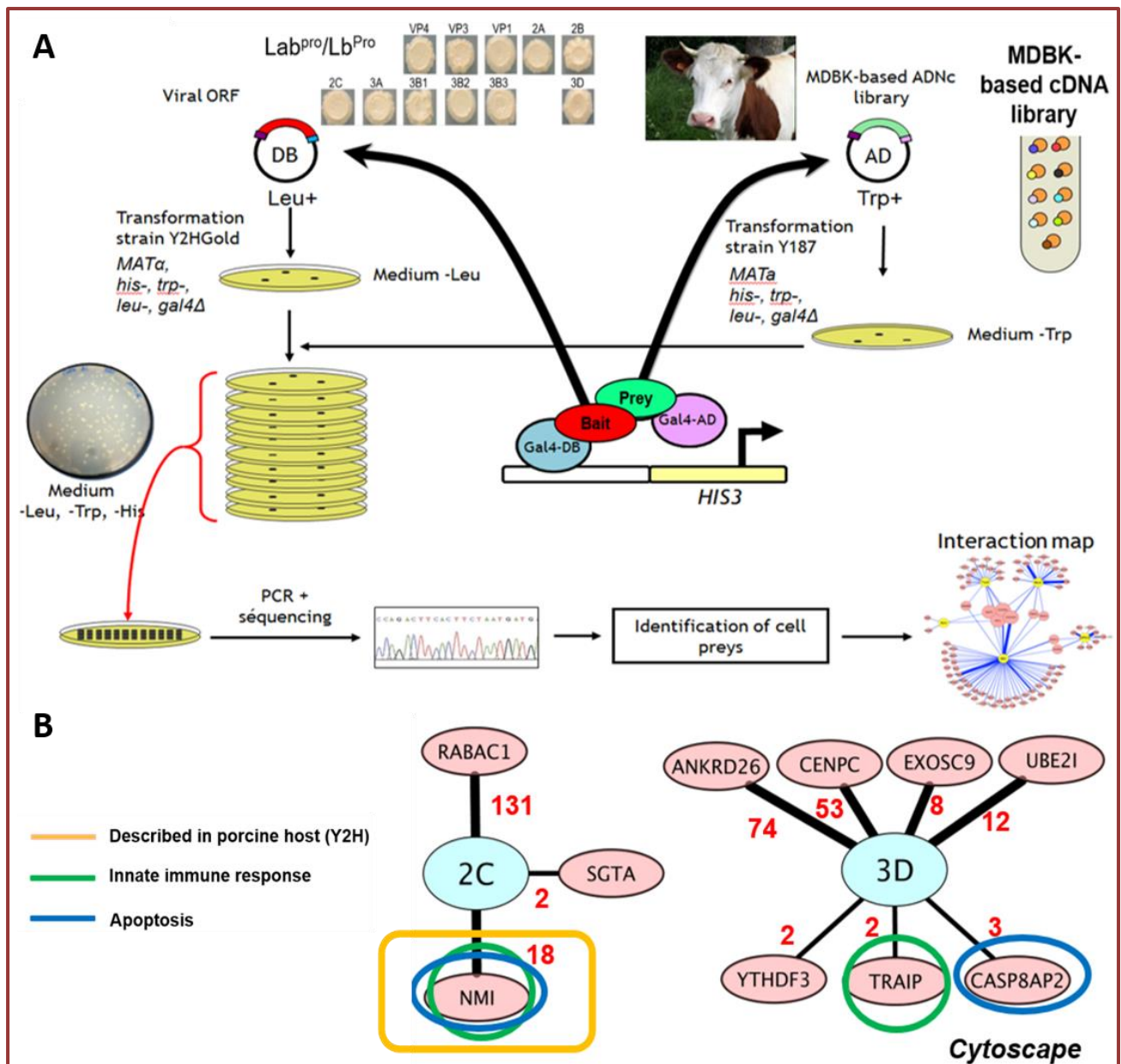


Figure 32 : Crible double hybride en levure pour identifier des interactions protéine-protéine entre le virus de la FA et cellules bovines. A : principe du test et étapes d'analyse B : cartes d'interactions obtenues pour les protéines non structurales 2B et 3D.

Les interactions candidates pour la protéine 2C ont pu être confirmées par purification d'affinité GST-pull down, pour NMI et RABAC1 mais pas pour SGTA. Les confirmations n'ont pas été initiées pour les interacteurs de la 3D. Ces données seront sans doute reprises pour de futurs projets mais ne pouvaient pas être valorisées telles quelles. Ces travaux ont cependant permis à notre équipe de s'intégrer dans l'axe transversal interactions hôtes/virus mis en place par Damien Vitour au sein de l'UMR Virologie. Nous avons poursuivi ensuite cette transversalité pour le projet de thèse PersIFA détaillé ci-après.

A la suite du projet Transcriptovac et afin de poursuivre nos travaux sur interactions FMDV/hôte et mécanismes de persistance, j'ai répondu fin 2019/ début 2020 à 2 appels à projet : un appel à projet de thèse Anses et le 1^{er} appel à projet ICRAD. La **Figure 33** est une transition qui présente ces projets que je détaillerai ensuite pour clore cette partie I présentant mes activités de recherche.

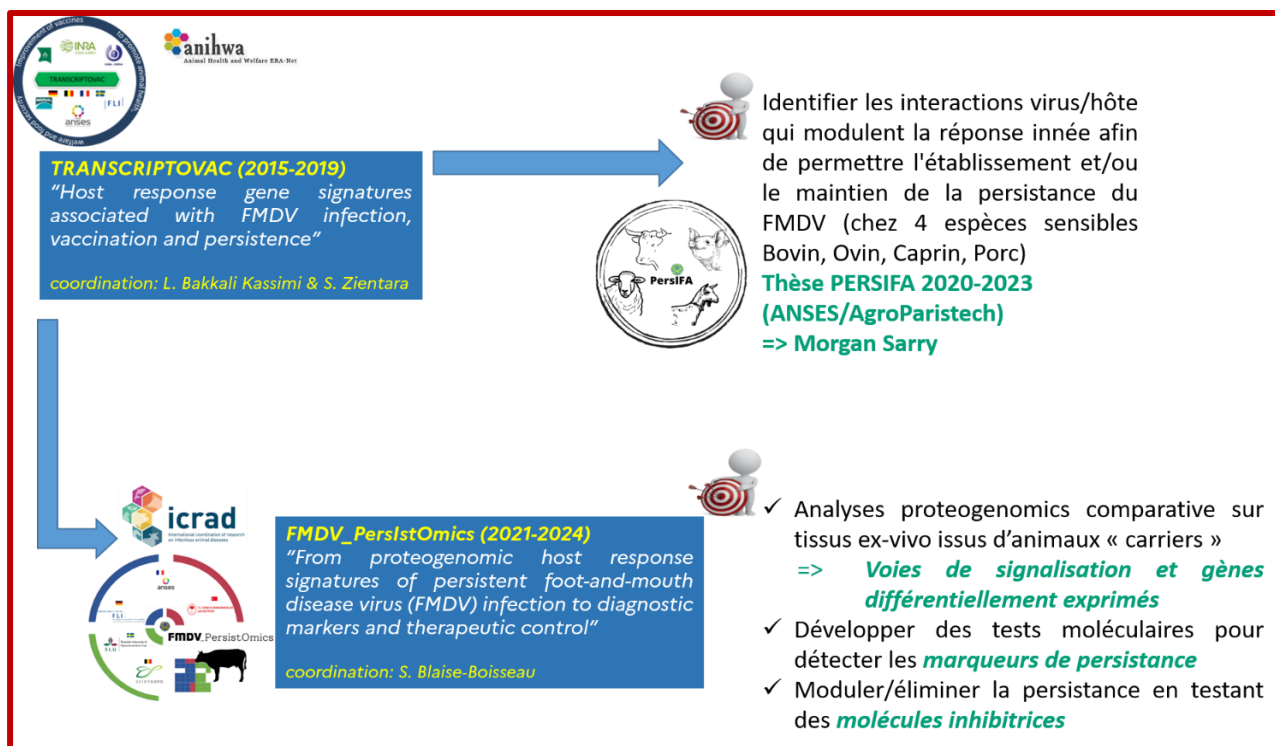


Figure 33 : Projets 2020-2024 dans la suite du projet Transcriptovac (2015-2019)

5.4 Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféactomique » chez 4 espèces cibles (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus* et *Sus scrofa*)

Afin de poursuivre ces travaux sur les interactions moléculaires entre le FMDV et son hôte, j'ai donc écrit le projet de thèse « PersIFA (2020-2023) » « Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféactomique » chez 3 espèces cibles (*Bos taurus*, *Ovis aries* et *Sus scrofa*) ». J'ai obtenu un demi financement Anses et notre candidat Morgan Sarry a obtenu la seconde moitié du financement par son succès au concours de l'ED ABIES en juin 2020. Ce projet s'inscrivait également dans la suite des résultats du projet Transcriptovac en identifiant les interactions virus/hôte qui modulent la réponse innée afin de permettre l'établissement et/ou le maintien de la persistance du FMDV. L'objectif majeur de ce projet de thèse était de mettre en évidence des interactions entre le FMDV et la réponse antivirale des interférons de type I et de déterminer leur éventuelle spécificité d'hôte i.e., leur conservation chez les différents hôtes étudiés.

Comme de nombreux virus, le FMDV a développé des stratégies d'échappement à la réponse innée, en ciblant principalement les interférons (IFN) de type I. les stratégies décrites à ce jour sont synthétisées et détaillées en **Figure 34**.

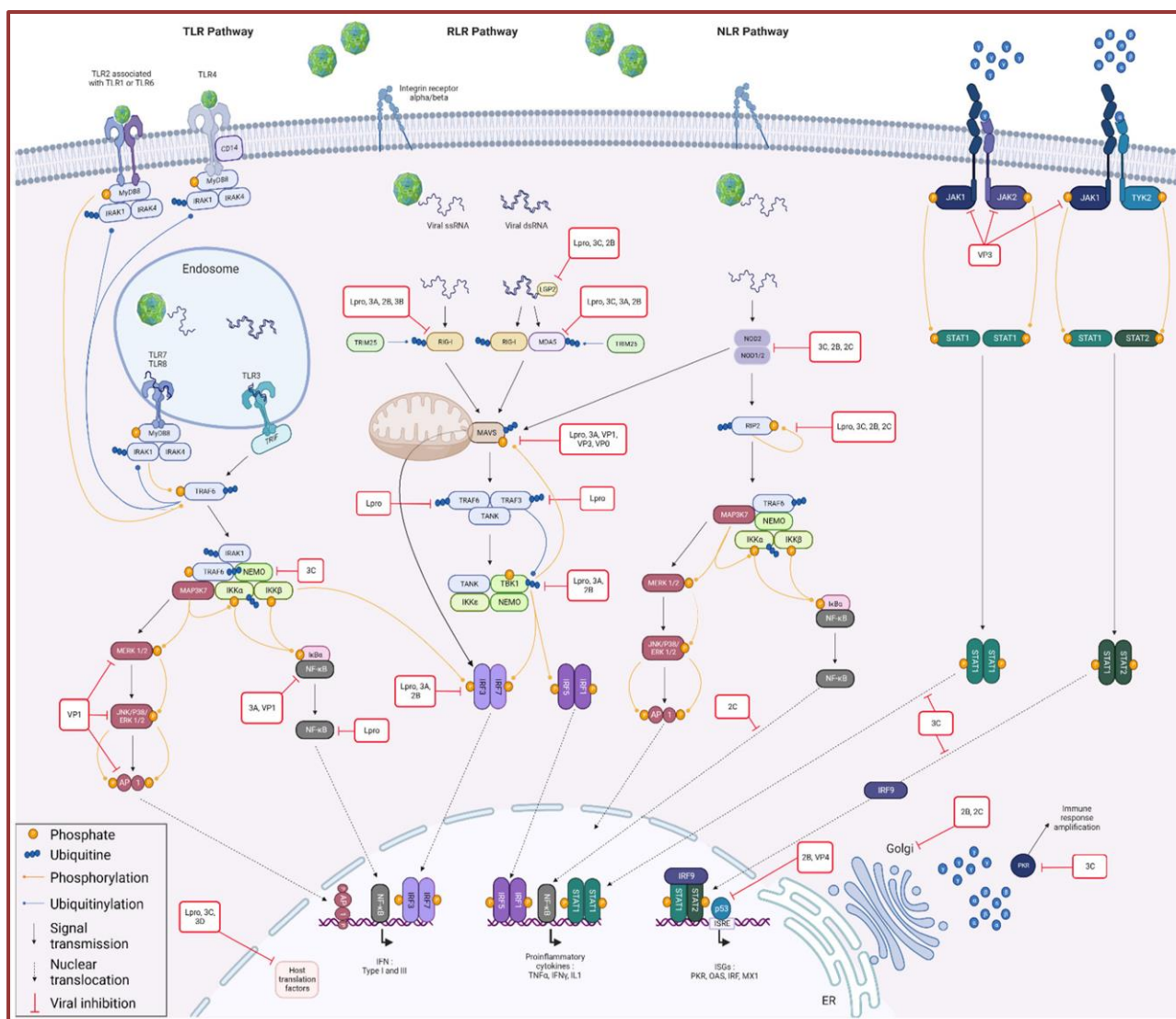


Figure 34 : Réponses immunitaires antivirales innées et antagonismes viraux décrits pour le virus de la fièvre aphteuse le virus de la FA interfère avec la détection de l'ARN viral en agissant sur les senseurs RIG-I, MDA5, LGP2 et NOD2 par l'intermédiaire de ses protéines Lpro, 2B, 2C, 3A, 3B et 3C. Il s'oppose également à la réponse immunitaire de l'hôte en ciblant les protéines impliquées dans la transduction du signal, telles que MAVS, RIP2, NEMO et TBK1, en interagissant par l'intermédiaire de ses protéines VP0, VP3, VP1, Lpro, 2B, 2C, 3A et 3C. La protéine Lpro du FMDV dégrade IRF3 et IRF7, tandis que les protéines 2B et 3A ne ciblent que IRF3. La voie MAPK est limitée par l'action de VP1, tandis que la voie NF-κB est affectée par VP1, Lpro, 2C et 3A. Le FMDV s'oppose également à la voie JAK/STAT par l'interaction VP3/JAK et en empêchant la translocation nucléaire des dimères STAT par l'intermédiaire de la protéase 3C. Au niveau nucléaire, Lpro, 3C et 3D sont impliqués dans l'inhibition des facteurs de traduction de l'hôte, tandis que VP4 et 2B régulent négativement la transcription des ISG. Les complexes de transport moléculaire associés à l'appareil de Golgi sont détournés par 2B et 2C, et certaines protéines antivirales, telles que PKR, sont dégradées par la 3C. **Sarry et al ; 2019** (26)

L'ensemble de ces données constitue ainsi un faisceau de présomptions concernant la mise en place d'un équilibre, entre présence du virus et réponse de l'hôte, via l'établissement d'interactions protéiques au cours de l'infection persistante.

Les antagonismes décrits entre les protéines du FMDV et les protéines de la voie IFN de type I ayant été rapportés dans des systèmes cellulaires issus de différentes espèces, souvent peu pertinents au regard de la physiopathologie du virus, l'objectif majeur de ce projet de thèse a été de mettre en évidence des interactions entre le FMDV et la voie IFN de type I et de déterminer leur éventuelle spécificité d'hôte. Les interactions établies entre les protéines du FMDV de sérotype O et seize protéines de la voie IFN de type I impliquées dans plus de 75% des interactions virus-hôte, provenant de trois espèces chez qui le virus persiste (*Bos taurus*, *Ovis aries* et *Capra hircus*) et d'une espèce chez qui le virus ne persiste pas (*Sus scrofa*) ont ainsi été mises en évidence par approche « interféromique ». Des plasmides exprimant les 16 protéines de la voie IFN I, sous leurs formes bovine, ovine, caprine et porcine, et des vecteurs d'expression des 15 protéines du FMDV ont été construits. Les IPP ont été identifiées par NanoLuc-2-Hybrid (**Figure 35**)

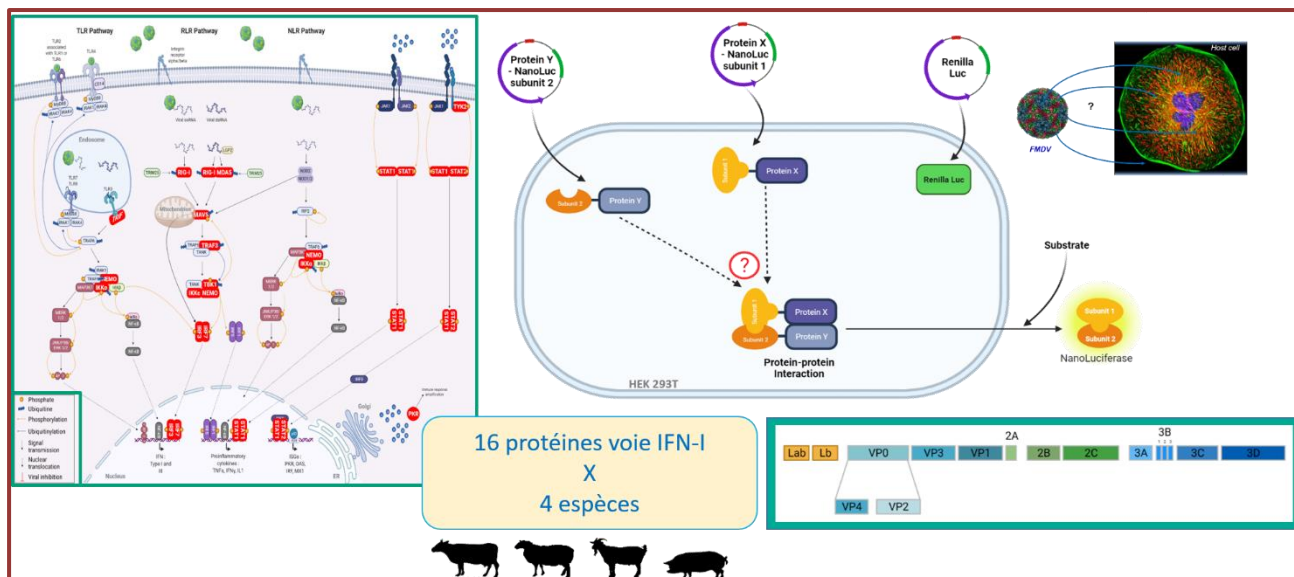


Figure 35 : Identification d'interactions protéine-protéine (IPP) entre les protéines de la voie IFN de type I et les protéines virales du FMDV de type O par criblage bioluminescent NanoLuc-2-Hybrid. *Adapté de figures du manuscrit de thèse de Morgan Sarry, 2023*

Les résultats les plus prometteurs concernent la polymérase 3Dpol pour laquelle aucune interaction avec la voie interféron n'avait jamais été décrite. Les IPP 3Dpol-hôte ont été confirmées par chromatographie d'affinité pour les quatre espèces. Nous avons ainsi montré que la 3Dpol interagissait avec IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 et NEMO sous leurs formes bovine, ovine, caprine et porcine, et avec MAVS, uniquement sous sa forme porcine (**Figure 36**).

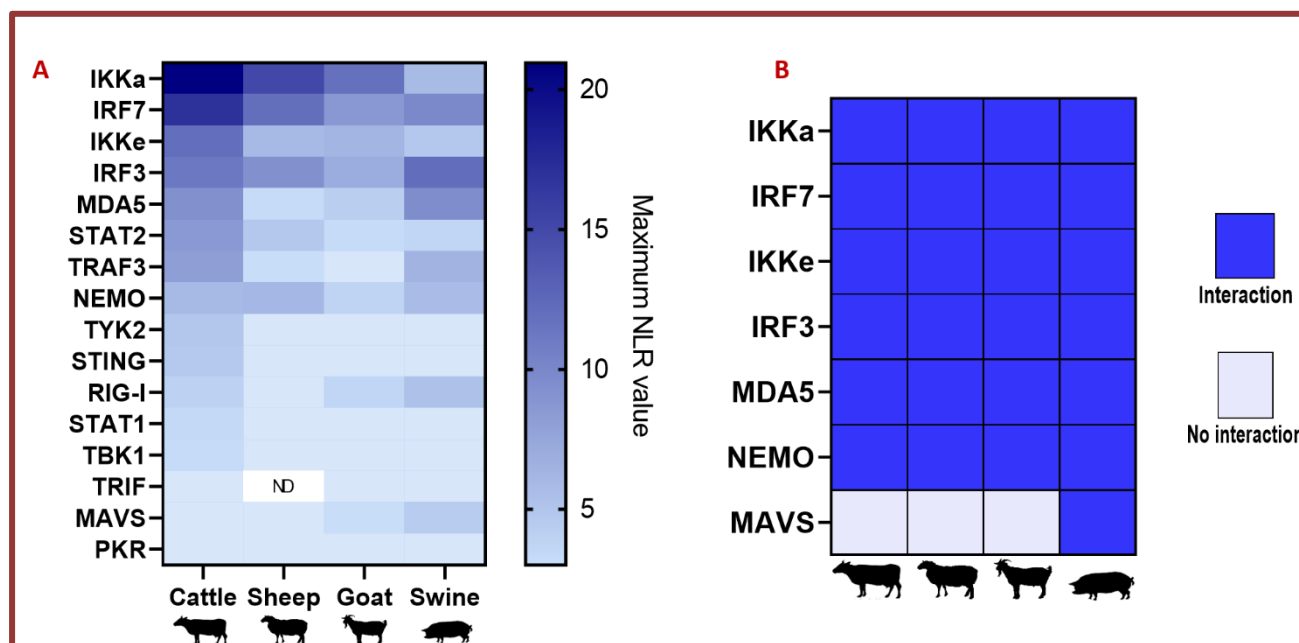


Figure 36: Identification de sept interactions entre des protéines de la voie IFN-I et la polymérase 3D du FMDV de type O, par crible Nanoluciférase. A : « heatmap » comparant les forces relatives associées à chaque interaction testée par criblage NanoLuc-2-hybride entre FMDV 3Dpol et les seize protéines de la voie IFN issues des banques bovine, ovine, caprine et porcine. Adapté de Sarry et al, 2023 (34) B : Confirmation par GST pull-down des IPP précédemment identifiées entre FMDV 3Dpol et sept protéines de la voie IFN dérivées de bovins, d'ovins, de caprins et de porcins. *Sarry, et al ; 2023* (34)

En outre, nous avons démontré par des tests rapporteurs luciférase l'effet inhibiteur de la polymérase 3Dpol sur la phase d'induction de la réponse interféron (**Figure 37**). Ces résultats combinés suggèrent fortement que 3Dpol pourrait jouer un rôle insoupçonné dans l'échappement du FMDV à la réponse IFN de l'hôte et potentiellement dans sa persistance.

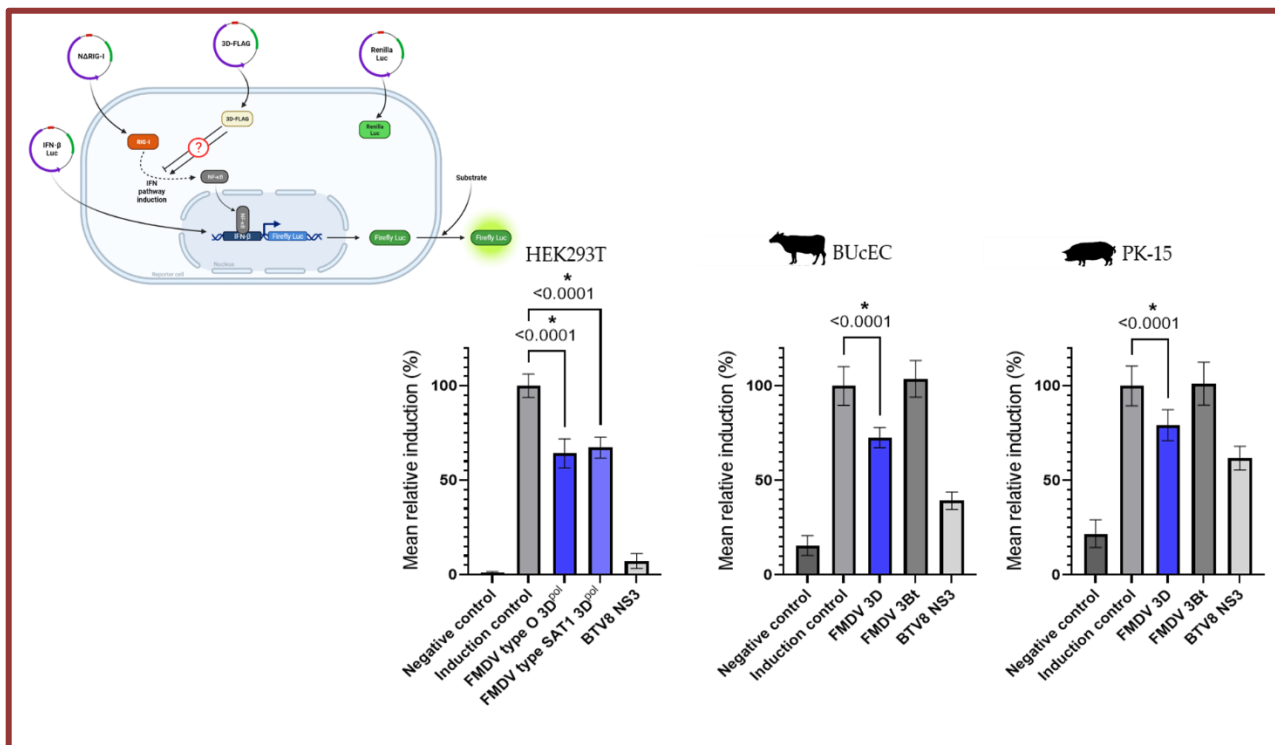


Figure 37: Inhibition de la phase d'induction de la voie IFN de type I par la polymérase 3D du FMDV Les cellules humaines HEK293T, bovines BUCeC et porcines PK-15 ont été co-transfectées avec un vecteur codant pour un gène rapporteur IFN-β-luciférase, un vecteur responsable de l'expression d'une protéine RIG-I constitutivement activée, un vecteur codant pour un FMDV 3Dpol marqué par FLAG et un vecteur de normalisation. La protéine RIG-I activée déclenche l'induction de la voie IFN, ce qui entraîne l'activation de facteurs de transcription tels que IRF3. Ces facteurs de transcription induisent l'expression du gène rapporteur, ce qui entraîne l'expression d'une protéine luminescente. L'ajout d'un substrat permet de lire cette luminescence. Après comparaison avec des contrôles, la luminescence quantifiée en présence de FMDV 3Dpol indique si FMDV 3Dpol a un effet sur la phase d'induction de la voie IFN et si son effet est plutôt inhibiteur ou activateur de cette voie. **Sarry, et al ; 2023** (34)

Ces travaux de thèse ont également permis le développement de modèles de cellules primaires porcines et ovines adaptés à l'étude du FMDV par analogie avec celui développé avec des cellules primaires bovines. L'infection de ces modèles à court et long terme par le FMDV a été caractérisée et comparée aux observations in vivo présentées dans la littérature. A terme, ces modèles pourraient constituer une alternative aux lignées cellulaires actuellement utilisées et ne provenant pas de tissus d'intérêt. Ces modèles constituent également des outils permettant l'étude des réponses de l'hôte lors de l'infection par le FMDV et ont pour vocation de permettre la validation des interactions protéiques mises en évidence au cours de cette thèse, en contexte infectieux. Dans cette optique, la réactivité d'anticorps ciblant les protéines de la voie IFN de type I a été testée face aux protéines issues des quatre espèces d'étude. Les deux références ayant été validées ont ensuite été utilisées en vue de mettre en évidence les interactions entre les protéines IKKε, NEMO et la polymérase 3D du FMDV.

Morgan Sarry, dont la thèse a été dirigée par Labib Bakkali Kassimi et encadrée par moi-même a soutenu brillamment sa thèse le 18 septembre 2023. Ses résultats ont été valorisés par 1 revue et 2 publications de travaux originaux ainsi que par de nombreuses communications orales ou affichées lors de colloques nationaux ou congrès internationaux.

Dans l'objectif de développer des modèles pertinents pour étudier la persistance du FMDV chez les ruminants, et en continuité du projet Transcriptovac, Eve laloy et moi-même avons obtenu un financement par le conseil scientifique de l'ENVA pour le projet Epithélov « Des modèles in vitro d'épithélium ovin pour étudier la pathogenèse de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse ». Nous avons pu, toujours en collaboration avec le SLU, isoler des cellules épithéliales ovines issues de palais mou et étudier la persistance du FMDV dans ces cultures primaires, en monocouches ou multicouches sur inserts de collagènes, par analogie avec le modèle bovin.

Après le départ d'Eve Laloy en 2020 pour le laboratoire de Dozulé, Morgan Sarry, notre doctorant, a poursuivi les travaux sur les cellules ovines (Un manuscrit concernant le modèle primaire ovin a été soumis pour publication dans *Frontiers in Microbiology* fin septembre 2023) ; tout en développant également des cultures

primaires issues de palais mou porcin, toujours en lien avec son projet de thèse interrogeant la persistance différentielle selon les espèces. A noter que la persistance de FMDV infectieux a été décrite chez les ruminants mais pas chez le porc. Morgan a ainsi réussi à développer un modèle cellulaire primaire de palais mou dorsal porcin sensible à l'infection par le virus de la fièvre aphteuse et d'autres virus de maladie vésiculeuse entrant dans le diagnostic différentiel de la fièvre aphteuse. Un modèle similaire basé sur les cellules de l'amygdale oropharyngée n'a pas pu être développé faute d'avoir pu maintenir ces cellules en culture. Des infections ont été réalisées en monocouches et en multicouches à l'interface air-liquide. Conformément à ce qui a été observé in vivo chez les porcs, aucun signe de persistance du virus de la fièvre aphteuse n'a pu être détecté dans notre modèle cellulaire (aucun virus infectieux détecté après 28 jours). Les **Figure 38 et 39** présentent une synthèse de ce projet porcin.

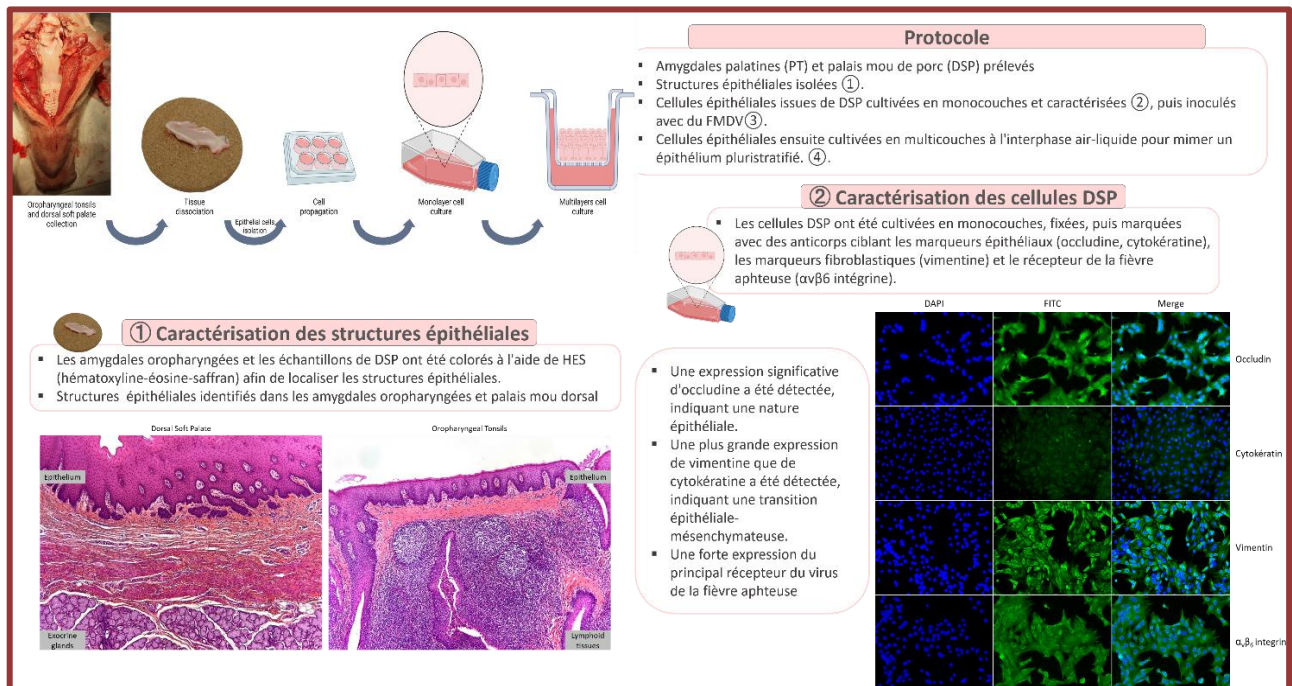


Figure 38 : Isolation de cellules de palais mou porcin et caractérisation *Adapté de Sarry, et al ; 2023* (35)

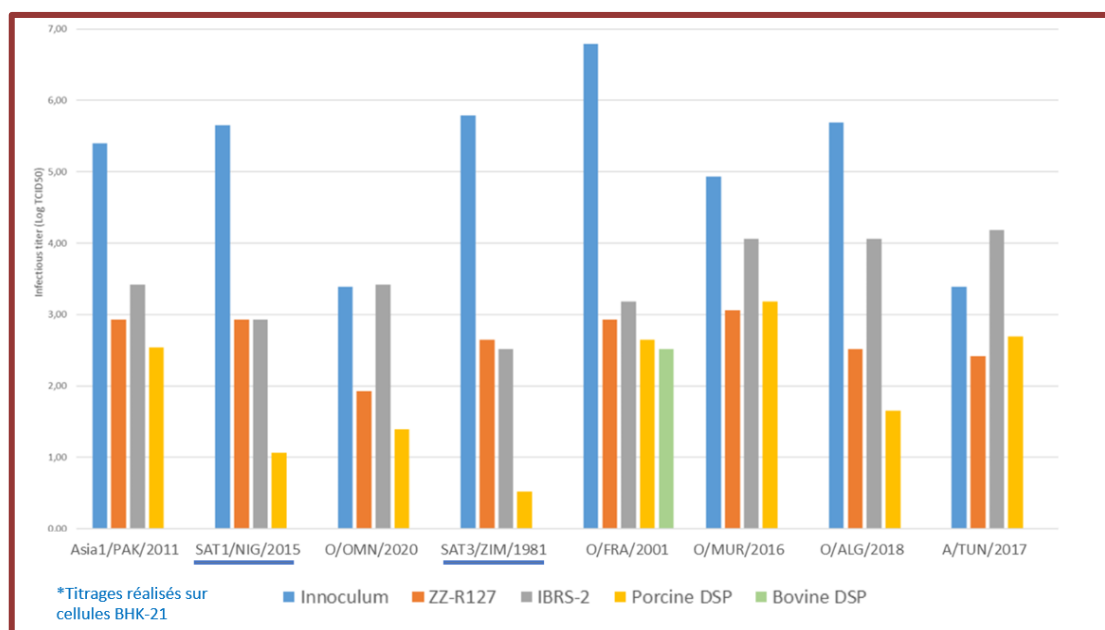


Figure 39 : Sensibilité des cellules DSP porcines au FMDV. *Adapté de Sarry, et al ; 2023* (35) Des cellules DSP porcines ont été infectées avec un panel de souches de FMDV afin de comparer leur sensibilité à celle d'autres lignées cellulaires : cellules de la lignée épithéliale de langue de chèvre ZZ-R127, cellules de la lignée épithéliale de rein de porc et DSP primaires bovines. 48hpi, les surnageants ont été prélevés pour titrer le virus FA sur cellules BHK-21, par la méthode des TCID₅₀.

Comme montré en **Figure 39**, les DSP porcines sont sensibles aux sept souches testées. Elles sont également sensibles aux virus de la maladie vésiculeuse du porc (MVP), au virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et ainsi qu'au virus Senecavirus (SVA), virus ayant émergé depuis 2014 (Canada, Brésil, Etats-Unis et Chine) et ayant causé un foyer en 2022 au Royaume-Uni (premier cas de la maladie en Europe). Ces cellules pourraient constituer un outil privilégié dans le diagnostic de la fièvre aphteuse (diagnostic différentiel inclus) et pour les travaux de recherche. Ces travaux ont été valorisés par différentes communications orales et affichées et par une publication.

Projet de thèse PersIFA de Morgan Sarry Anses/AgroParistech	Travaux publiés dans <i>Viruses</i> (3 et 4) et <i>Frontiers in Microbiology</i> (1)
---	--

5.5 Persistance du virus de la fièvre aphteuse: des signatures protéogénomiques de la réponse de l'hôte aux marqueurs diagnostiques candidats et au contrôle thérapeutique

Dans la suite des résultats du projet Transcriptovac ayant montré que dans le modèle DSP bovines, la persistance du FMDV s'accompagne d'une réponse antivirale innée durable mais diminuée et inefficace pour éliminer le virus, contribuant vraisemblablement à l'équilibre maintenu entre présence du virus et réponse de la cellule hôte, nous avons souhaité poursuivre nos recherches, toujours en collaboration avec le SLU. Nous avons entrepris de tester l'effet du Ruxolitinib, inhibiteur spécifique de la cascade de signalisation JAK/STAT intervenant dans la réponse Interféron de type I. Notre hypothèse de travail était que l'inhibition de la réponse interféron résiduelle caractérisant la persistance en modèle DSP permettrait de rompre l'équilibre virus/cellule. Le virus « persistant » accomplirait alors à nouveau un cycle viral conduisant à la lyse cellulaire sans possibilité de rétablir ensuite une infection persistante. Ce travail a été réalisé, pour la partie analyses des échantillons, dans le cadre du stage de Master 2 de Gael Penverne, étudiant Ingénieur de février à août 2020 (Projet FMDV-Ruxo), puis repris sur 2021 en raison de la pandémie de Covid19. La **Figure 40** montre le schéma expérimental et la stratégie d'analyse des échantillons prélevés au cours de l'essai conduit sur 35 jours post inoculation.

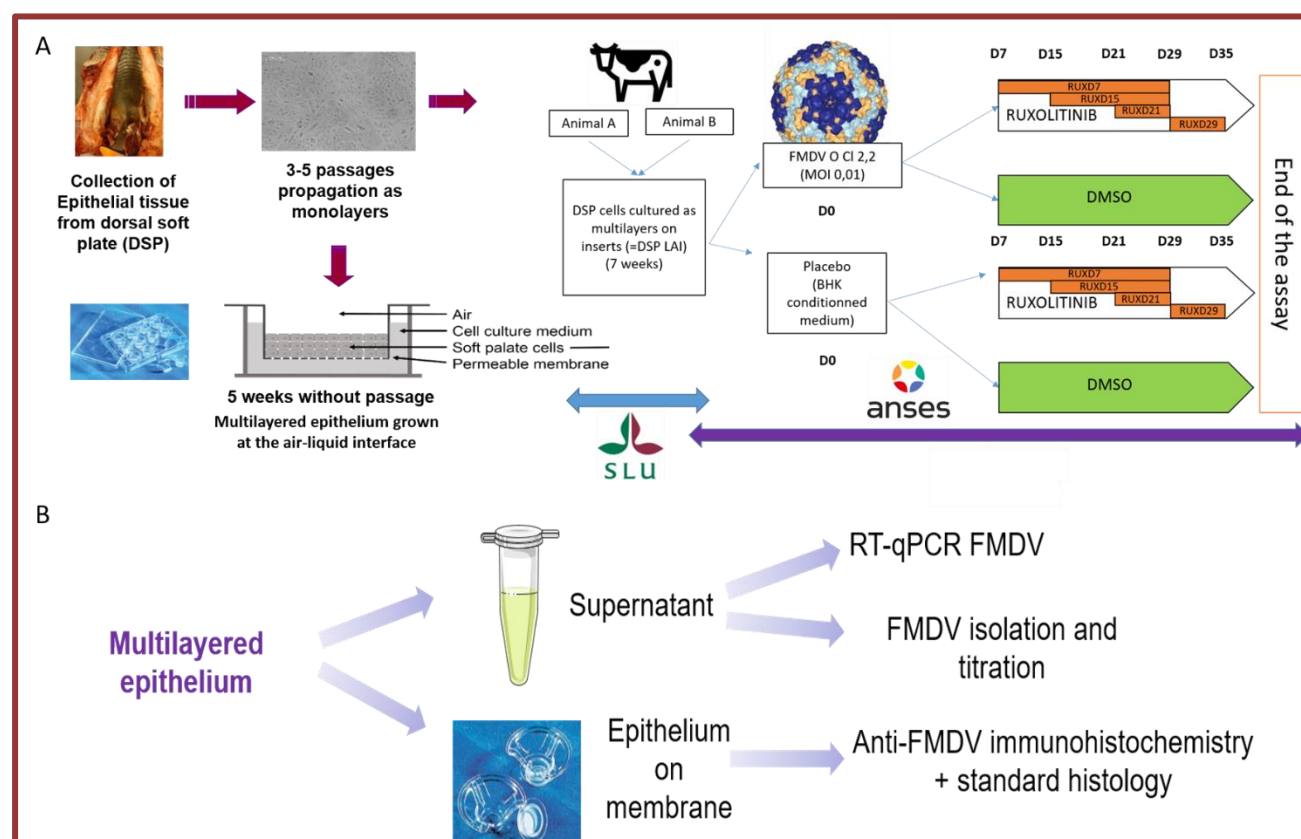


Figure 40 : Test de l'effet du Ruxolitinib sur la persistance du FMDV dans le modèle DSP bovines IAL
Schéma expérimental et plan d'analyse des échantillons Des multicouches de DSP issues de deux animaux ont été inoculées avec le virus FMDV O Clone 2.2 ou un milieu conditionné de cellules BHK-21. Le Ruxolitinib (10µM) a été ajouté dans le milieu de culture à partir de 7, 15, 21 ou 29 jours post inoculation. Le DMSO, diluant du Ruxolitinib a été utilisé comme contrôle de traitement.

Les résultats obtenus pour cette étude pilote montrent une modulation de la persistance du FMDV par le Ruxolitinib. Plus précisément, le Ruxolitinib conduit à une augmentation du titre viral, du génome viral, (**Figure 41** montrant une partie des résultats obtenus pour les cellules issues de l'animal A) ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'antigène 3D (IHC) assorti d'une lyse accrue des cellules (observée dans les 5 à 7 jours après l'ajout du Ruxolitinib). Ces données démontrent que l'inhibition de la signalisation JAK de la voie IFN de type I entraîne une rupture de l'équilibre entre le virus et la cellule hôte.

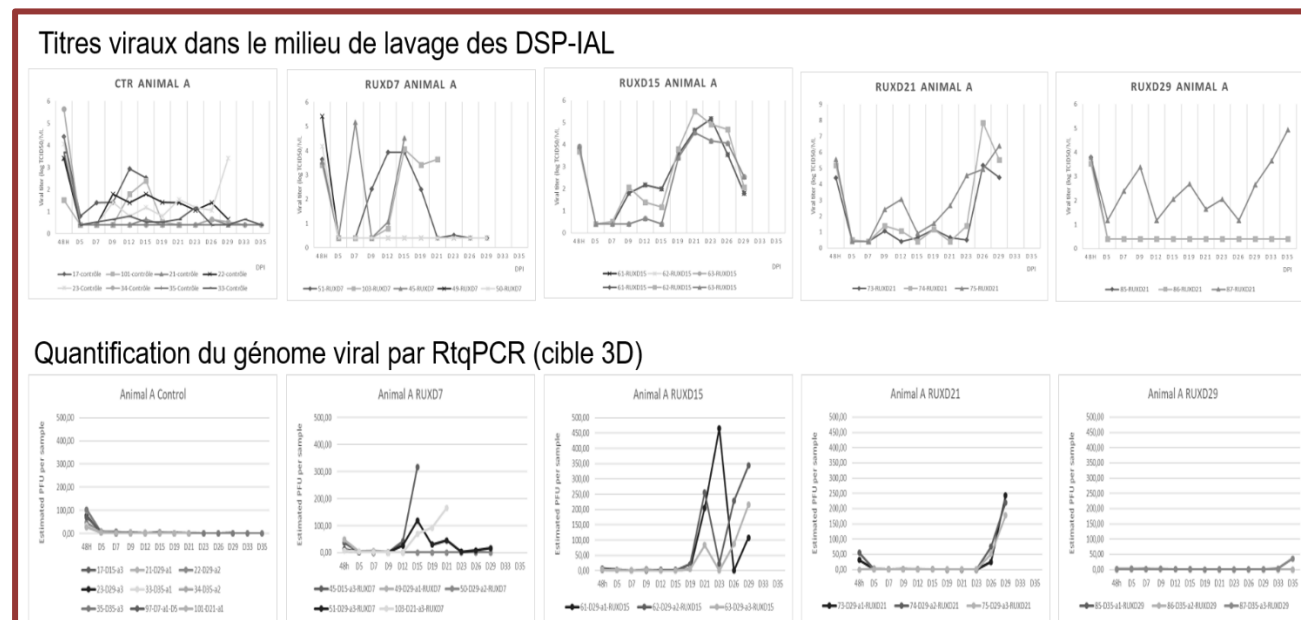


Figure 41 : Modulation du virus FMDV par le Ruxolitinib dans un modèle d'infection persistante de cellules DSP bovines cultivées à l'interface air-liquide (IAL) *Laloy et al, manuscript en préparation*

Afin de pouvoir poursuivre et financer les activités de recherche dédiées à l'élucidation des mécanismes sous-jacents, au contrôle thérapeutique et au diagnostic de la persistance du FMDV, j'ai coordonné, en consortium avec le FLI (Allemagne), le SLU (Suède), Sciensano (Belgique) et le SAP (Turquie), en mars 2020 puis pendant l'été 2020, la rédaction et la soumission du **Projet ICRAD FMDV-PersistOmic** « From proteogenomic host response signatures of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection to diagnostic markers and therapeutic control ». Ce projet dont j'assure la coordination (+ la responsabilité du WP2), a été financé pour 36 mois. Il a démarré le 31 mars 2021. Le projet FMDV_Persistomics s'inscrit directement dans la continuité des résultats du précédent projet Transcriptovac et des résultats du projet FMDV-Ruxo, et vise à déterminer les mécanismes et les facteurs qui peuvent aider à prévenir ou à contrôler l'infection persistante et à améliorer le diagnostic des animaux porteurs asymptomatiques. Le projet vise précisément à (i) mettre en évidence les altérations de la réponse de l'hôte au cours de l'infection persistante des bovins par le virus de la fièvre aphteuse (ii) évaluer les gènes fortement régulés au cours de la persistance du virus en tant que marqueurs cellulaires candidats de l'infection persistante (iii) identifier les voies qui pourraient être ciblées pour prévenir l'établissement de la persistance du virus ou mettre fin à l'infection. (**Figure 42**).

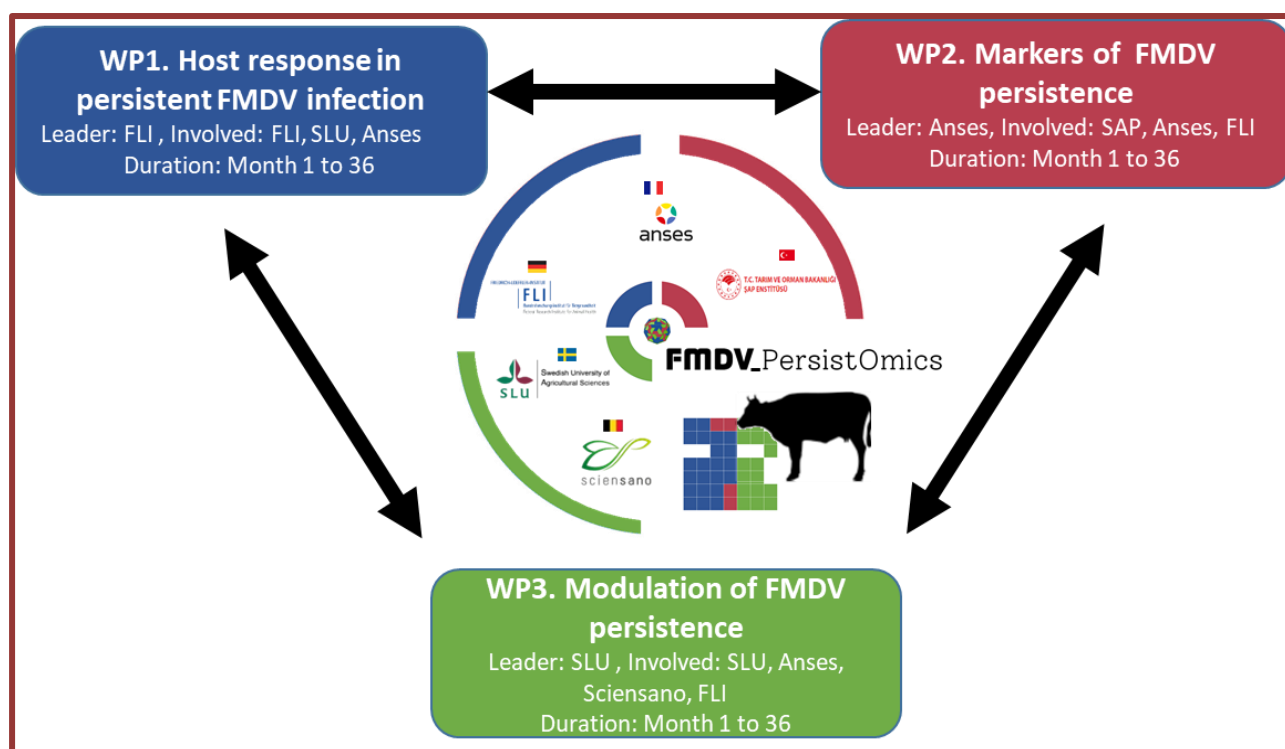


Figure 42 : Projet FMDV_PersistOmics (2021-2024)

Pour mener les travaux scientifiques de ce projet, j'ai recruté Caroline Michaud, chargée de projet post-doctorante (15 novembre 2021 au 30 juin 2023) et je co-supervise la thèse d'Ignacio Alvarez (doctorant SLU, 2020-2024) qui a déjà réalisé 2 séjours au laboratoire pour les expérimentations sur culture primaires de cellules DSP pour les WP1 et 3.

Des résultats ont été obtenus dans chaque workpackage et notamment pour le rôle de la protéine leader sur la persistance virale (WP1, tâche 3), in vitro comme in vivo :

Une infection subclinique, comme l'infection persistante par le FMDV peut se produire si un virus peut contrecarrer la réponse immunitaire de l'hôte. Dans le cas du virus de la fièvre aphteuse (FMDV), la principale protéine virale connue pour être impliquée dans l'évasion de la réponse innée de l'hôte au cours de l'infection aiguë est la protéase leader Lpro. En effet, il a été démontré précédemment que la délétion de la région codant pour la Lpro permet d'obtenir des virus très atténués in vivo. Si les virus de type sauvage et les virus sans protéine leader se répliquent au site primaire de l'infection dans le nasopharynx, les virus dépourvus de protéine leader ne parviennent pas provoquer une virémie et une expression clinique de la FA. Il n'a cependant pas été étudié si de tels virus pouvaient établir une infection persistante. Dans le cadre du WP1, nous avons étudié si un FMDV O (Clone 2.2 toujours) recombinant délété de la protéine leader pouvait persister in vitro dans des cellules DSP bovines cultivées à l'interface air-liquide (IAL). Dans cet essai, les cellules DSP ont été cultivées sur des inserts pendant cinq semaines, puis inoculées soit avec le virus sauvage (O FRA Clone 2.2), soit avec son dérivé délété : O FRA delta Lpro, soit avec un placebo. Les cellules de la couche la plus externe ont été lavées avec du milieu de culture 6, 12, 24 et 48 heures après l'infection, puis tous les deux/trois jours jusqu'à 35 jours après l'infection. Le milieu de lavage a été analysé pour détecter le virus infectieux de la fièvre aphteuse et l'ARN viral. Le virus wt vivant a été isolé dans les surnageants de 5 parmi 6 cultures, tandis qu'aucun virus vivant mutant n'a été détecté après 48 heures d'inoculation de DSP-IAL. Ces résultats ont été confirmés par titrage viral. De même, l'ARN viral mutant a diminué de 7dpi à 28dpi jusqu'à devenir indétectable à 35dpi. Une analyse protéogénomique viendra compléter ces données. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que le virus O de la fièvre aphteuse délété de la protéine Leader ne peut pas établir une infection prolongée ou persistante dans les cellules DSP bovines IAL (**Figure 43**). Dans une étude complémentaire présentée à la conférence GFRA par Litz et al, (collaborateurs du FLI) le virus mutant s'est également révélé fortement atténué chez les bovins et incapable d'établir une infection persistante. Une publication est en cours de rédaction et j'ai présenté ces résultats oralement lors du GFRA en Ouganda début novembre.

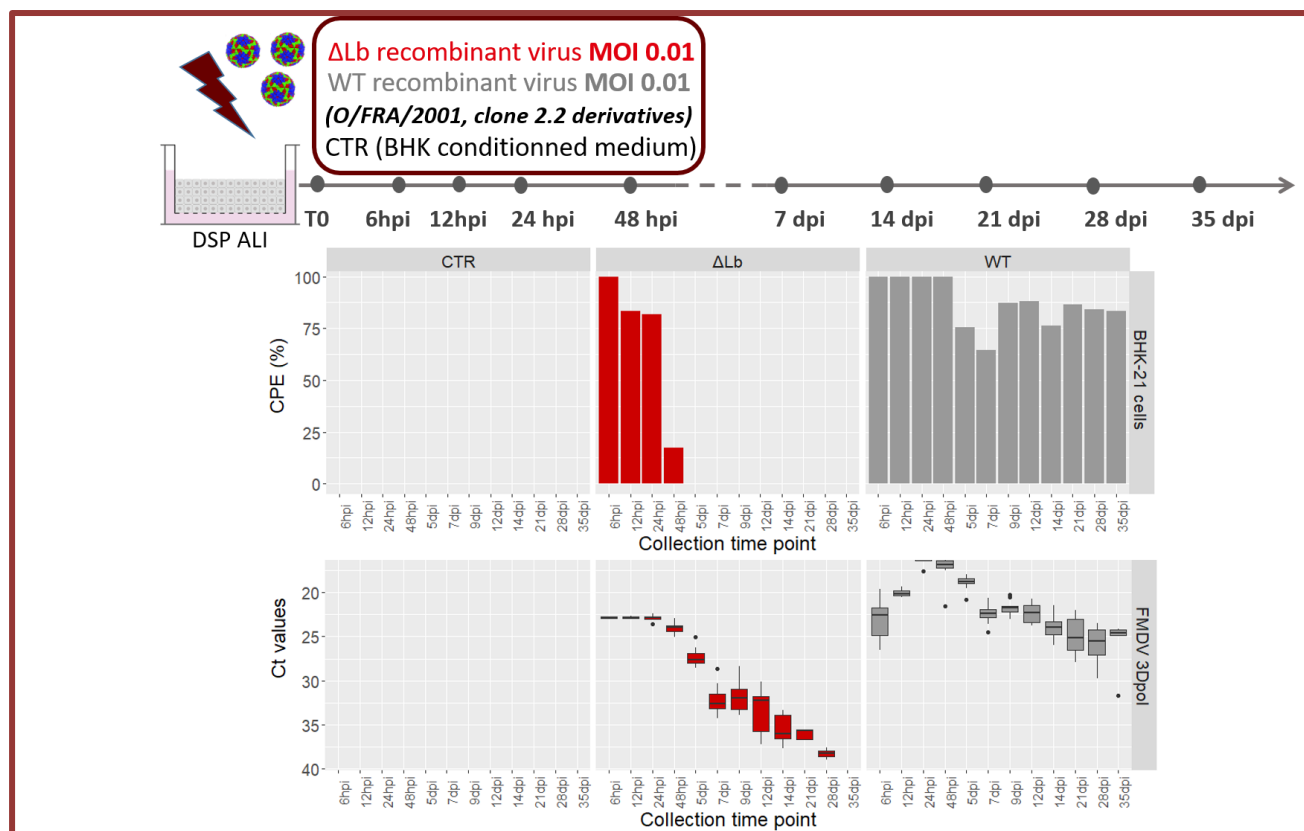


Figure 43 : Le virus O de la fièvre aphteuse délété de la protéine Leader ne peut pas établir une infection prolongée ou persistante dans les cellules DSP bovines cultivées à l'interface air-liquide (IAL)

CONCLUSION

Je suis arrivée dans le domaine dans la virologie en passant par le monde fascinant des rétrovirus endogènes et donc déjà dans le sujet des interactions virus/hôtes « ancestrales ». Mon doctorat m'a ainsi ouvert les portes de la rétrovirologie et j'ai eu la chance de travailler aux côtés de Mme le Professeur Françoise Barré-Sinoussi pour un contrat post-doctoral au final court mais très enrichissant. J'ai pu me former à la manipulation du VIH-1 en laboratoire NSB3 et à la culture de cellules primaires de placenta humain afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le contrôle du VIH-1 dans des cellules trophoblastiques humaines naturellement résistantes à l'infection. Mon expérience doctorale et post-doctorale m'ont permis d'être recrutée en tant que CR2 en 2005 à l'AFSSA (Anses aujourd'hui), dans l'unité VAE du LERQAP (actuel LSAI).

Mes quatre années passées dans l'unité de virologie des aliments et de l'eau (VAE) du LERQAP de 2005 à 2009 m'ont permis d'acquérir une expérience en virologie appliquée à la sécurité alimentaire. Durant cette période, j'ai eu l'occasion de mener des projets de recherche et développement destinés à améliorer les outils de détection des virus entériques dans les matrices alimentaires. Ce travail en équipe et également en collaboration avec des partenaires français, étrangers ou issus du monde industriel a été de plus valorisé sous la forme de trois publications et diverses communications orales ou affichées. Afin d'évoluer dans ma carrière au sein de l'agence, j'ai souhaité, en 2009, rejoindre l'UMR de Virologie du laboratoire de santé animale et plus particulièrement l'équipe « Biologie des Picornavirus » afin de poursuivre ma carrière de chercheuse dans le domaine de la santé animale. Cette mutation m'a permis de rejoindre une équipe au sein de laquelle mon expérience et mes compétences antérieures ont été rapidement mises à profit. J'ai ainsi été impliquée dès mon arrivée dans différents programmes européens (« FMD-Disconvac », « Anibio-threat ») ainsi que dans le co-encadrement de la thèse d'Evelyn HOUNDJÉ, étudiante Béninoise. En parallèle de ces projets de recherche, j'ai poursuivi mon implication dans les missions d'AST et de référence relatives au LNR fièvre aphteuse qui avait alors pour objectif d'obtenir l'accréditation pour un certain nombre de méthodes de diagnostic. J'ai également pu suivre le cours de virologie fondamentale de l'Institut Pasteur par formation continue et obtenir le DU correspondant.

Après avoir pris mes marques dans l'équipe, j'ai souhaité développer des travaux de recherche, sur un plan plus fondamental, dans l'objectif d'un meilleur contrôle épidémiologique du virus de la fièvre aphteuse.

J'ai ainsi proposé à l'équipe de nous intéresser aux mécanismes de la persistance virale du virus FMDV (ou portage asymptomatique). En effet, chez certains ruminants et chez le porc, le virus de la FA peut être isolé plus de 28 jours après l'infection (animaux dits « porteurs »). Même chez les animaux immunisés (après vaccination ou infection), le contact avec le virus peut entraîner une infection persistante, sans manifestation de signes cliniques de la maladie. De tels « porteurs », pourraient être à l'origine des cas de FA, en entretenant et diffusant le virus. Il a même été montré très récemment que les animaux porteurs pouvaient être à l'origine de souches recombinantes en cas de surinfection. J'ai ainsi déposé un projet de thèse intitulé « Etude des déterminants moléculaires impliqués dans la persistance du virus de la fièvre aphteuse » pour lequel j'ai obtenu le financement complet pour une doctorante de 2011 à 2014. Ces premiers travaux sur la persistance du virus de la fièvre aphteuse ont permis de mettre en place au laboratoire un modèle *in vitro* de persistance en lignée bovine. Ce travail a pu être poursuivi dans le cadre du projet Transcriptovac (2015-2019), coordonné par notre équipe. J'ai été particulièrement impliquée dans la rédaction du WP2 et la mise en œuvre des travaux scientifiques de cette partie du projet. Ce projet a été pour moi le début d'une collaboration très fructueuse avec nos collègues du SLU pour la mise en place de modèle de persistance du FMDV en cultures bovines primaires. J'ai également pu collaborer avec les collègues du FLI sur ce projet dont les résultats ont été valorisés par 2 publications.

Pour pouvoir poursuivre cette thématique de recherche, j'ai proposé à mes collaborateurs de répondre à un appel ICRAD fin 2019 et nous avons obtenu en novembre 2020 le financement de ce projet FMDV_PersistOmics que je coordonne et qui regroupe 5 partenaires internationaux. Toujours sur cette thématique j'ai obtenu un financement pour le doctorat de Morgan Sarry, dont le projet interroge sur les liens entre persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée. Morgan a soutenu brillamment sa thèse le 18 septembre dernier et a produit des résultats très intéressants pour notre thématique, ouvrant des perspectives de recherche que je détaillerai en partie II de ce manuscrit.

En matière de recherche et développement de méthodes, je me suis investie dans différents projets visant à une meilleure détection moléculaire du FMDV, contribué à des projets sur l'épidémiologie moléculaire du FMDV mais également au développement de méthodes pour faciliter l'envoi d'échantillons de terrain vers les laboratoires de référence, afin d'améliorer la caractérisation des souches circulant en pays endémique. L'utilisation de LFDs inactivés pour l'envoi à faible coût d'échantillons de terrains positifs pour la fièvre aphteuse a été développé puis évalué dans le cadre de 2 projets financés par l'EuFMD. J'ai assuré la coordination du second projet impliquant 5 partenaires internationaux sur 18 mois. J'ai pu participer à l'évolution de nos mandats en lien avec l'important travail fourni par notre équipe. Tous les travaux de diagnostic et référence menés en BIOPIIC nourrissent les projets de recherche ce qui permet une cohérence et une synergie d'équipe très appréciables. Pour toutes les activités de recherche que je mène, je soulignerai également aussi ici le bénéfice considérable des collaborations internationales établies, la richesse inquantifiable des échanges scientifiques et humains.

Au sein de l'équipe Biopic, depuis 2009, j'ai enfin encadré de nombreux stagiaires de différents niveaux. J'ai également progressivement encadré plusieurs techniciens. Depuis quelques années, je pilote les différents projets de recherche de l'équipe et assure le management transversal des collègues et collaborateurs impliqués dans ces projets. En cela ma formation en management transversal en novembre 2021 m'a confortée et légitimée dans cette fonction. Il m'est très agréable de travailler au sein de l'UMR virologie et plus particulièrement au sein de l'équipe Biopic, enrichissante scientifiquement et humainement. J'y ai beaucoup appris, ai pu y évoluer et suis à présent responsable adjointe de l'équipe BIOPIIC.

Depuis 2020, la coordination du projet FMDV-PersistOmics et l'encadrement/co-direction de la thèse PersIFA ont été des étapes importantes dans mon évolution scientifique m'ayant conforté dans mon souhait de présenter ma candidature pour l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches.

PARTIE II : PROGRAMME DE RECHERCHE

La fièvre aphteuse, bien que maladie ancienne décrite dès 1514 reste toujours une menace d'actualité, aux portes de l'Europe. Par sa grande variabilité génétique et antigénique, l'absence d'immunité croisée entre ses sept sérotypes, sa capacité de survie dans l'environnement, sa grande contagiosité, son large spectre d'hôtes ainsi que sa biologie particulière, le virus de la FA reste d'intérêt majeur en santé animale et l'objet de nombreux travaux de recherche, de la biologie fondamentale au diagnostic en passant par la surveillance et les moyens de lutte. Depuis 2012, une stratégie mondiale de lutte contre la fièvre aphteuse a été adoptée avec un objectif d'éradication.

Dans les prochaines années, le programme de recherche que je propose s'inscrira dans la continuité de la thématique interaction FMDV/hôte(s) que je développe au sein de l'équipe depuis 2011 mais également en lien avec les thématiques de recherche plus appliquée, visant à de meilleures stratégies vaccinales et à améliorer le diagnostic de la fièvre aphteuse, du terrain au laboratoire de référence.

1. Interactions FMDV/hôte et mécanismes de persistance du FMDV

Le projet de thèse PersIFA mené par Morgan Sarry a conduit à identifier de nouvelles interactions hôtes-spécifiques jamais décrites auparavant, entre la polymérase 3D et différentes protéines de la voie d'induction de la réponse Interféron (IFN) de type I (34). Ces interactions ont été identifiées par crible double hybride nanoluciférase puis confirmées par purification d'affinité GST-Pull down et un effet inhibiteur de la 3D sur la réponse IFN1 a pu être mise en évidence. Dans la suite de ces résultats, je propose de poursuivre sur cette thématique interaction et persistance selon les axes et questions scientifiques suivantes :

1.1 Validation d'interactions en contexte infectieux

Cette validation initiée en fin de thèse par Morgan sera poursuivie. Cela nécessitera de connaître la cinétique d'expression des protéines virales et cellulaires au cours de l'infection mais également de disposer d'outils de détection adaptés et notamment des anticorps dirigés contre les protéines endogènes des différentes espèces d'intérêt. Morgan avait déjà commencé à sélectionner des anticorps d'intérêt et évaluer leur efficacité de reconnaissance et réaction croisée. Nous travaillons en effet avec des espèces (bovin, porc, caprin et ovine) pour lesquels les anticorps sont moins développés que pour la souris ou l'homme.

Pour l'interaction particulièrement intéressante entre 3Dpol et MAVS qui semble spécifique à la forme porcine de la protéine, aucun anticorps commercial n'étant disponible, nous avons pour objectif de produire un anticorps polyclonal dans un premier temps, en exprimant la protéine en système eucaryote vaccinal (MVA), système d'expression qui est à présent bien mis en place dans l'UMR et également dans notre équipe via le projet SPIDVAC.

1.2 Cartographie des domaines d'interaction de la 3Dpol avec les protéines cellulaires de la voie IFN I

Le but sera d'identifier les domaines d'interaction entre la 3D et les protéines cellulaires de la voie IFN I et notamment MAVS, interacteur hôte spécifique. Pour cela, des vecteurs d'expression correspondant aux versions tronquées de la protéine 3D par clonage Gateway seront construits puis utilisés pour transfecter des cellules HEK 293T. Ces protéines tronquées permettront de tester les interactions 3D/ protéines de la voie IFN, par chromatographie d'affinité et/ou crible NanoLuc-2-Hybrid.

1.3 Persistance et autophagie

La voie IFN de type I étant étroitement liée aux mécanismes d'autophagie et d'apoptose, en témoigne la capacité de la protéine MAVS à stimuler ces deux processus biologiques, il est possible que les interactions entre la 3Dpol et les protéines impliquées dans la voie IFN de type I puissent avoir des répercussions sur l'autophagie et plus particulièrement le détournement des autophagosomes. La subversion des structures de l'autophagie est également à l'origine de certaines organelles de réplication dans lesquelles le virus se réplique à l'abri des senseurs de la réponse antivirale ; ce qui pose question quand on pense persistance virale. Etudier les interactions potentielles entre la 3D et des protéines impliquées dans les mécanismes d'autophagie comme la protéine Bécline par exemple est une voie qui semble importante à explorer.

1.4 Interactions protéines-protéines FMDV/Buffle africain

Avec la thèse PersIFA, les interactions protéines-protéines (IPP) FMDV/Hôtes ont été investiguées avec les protéines d'un virus FMDV de sérotype O, et des protéines cellulaires issues de 4 espèces sensibles (bovin

domestique, chèvre, mouton et porc domestique), le porc ne développant pas d'infection persistante.

En pensant persistance du FMDV, le buffle africain apparaît de suite comme un hôte de choix pour mener des investigations hôte-spécifique et interroger sur le lien entre IPP et persistance. Sur le plan pratique, il est cependant nettement plus compliqué d'avoir accès à des explants de DSP de buffle et le génome du buffle africain est assez peu précisément annoté (36). Il existe cependant, à défaut de cellules primaires, une lignée de cellules de rein de buffle africain disponibles à l'institut Pirbright. Un MTA est déjà en signature avec une collaboratrice sud-africaine pour obtenir les souches FMDV des 3 sérotypes sud-africains (passages précoces issus de buffles). A minima, avoir ces cellules permettraient de pouvoir extraire des ARN cellulaires et cloner les homologues des 16 gènes de la voie IFN I (et pourquoi pas aussi de la voie de l'autophagie) pour pouvoir compélter nos cribles double hybride et investiguer des IPP FMDV/Buffle, en testant des protéines virales du sérotype O mais également des 3 sérotypes sud-africains.

Mon souhait ultime serait de pouvoir disposer d'explants de DSP de buffle africain pour pouvoir isoler des cellules épithéliales de DSP et développer un modèle d'infection persistante pour cette espèce. Cependant, d'une part, il est très difficile d'avoir accès à des buffles africains (en France la réserve de Sigean abrite des Buffles africains nains uniquement) et d'autre part, les buffles africains risquent dans une forte proportion d'être porteurs asymptomatiques de FMDV (le portage est de 5 ans en moyenne chez le buffle africain).

Très récemment cependant (Novembre 2023), dans le cadre du GFRA dans le cadre duquel j'ai été invitée à donner une keynote, j'ai rencontré un chercheur Tanzanien tout à fait enthousiaste pour m'aider sur cette thématique Buffle africain et qui pourra au minimum me fournir des prélèvements me permettant de pouvoir produire une banque d'ADN complémentaire de buffle. Sauf dans le cas de buffles destinés à l'abattage, il sera difficile de pouvoir prélever du palais mou. De plus, même envoyé dans du milieu de culture, les tissus de seront pas exploitables pour isoler des cellules DSP. L'alternative serait alors de pouvoir prélever et isoler dans la foulée les cellules épithéliales du DSP de buffle. En pratique, je vais initier une collaboration avec Christopher Kasanga (Tanzanie) en partenariat aussi avec Jean-François Valarcher et Sara Häggglund du SLU en Suède. Ma participation à ce congrès qui se déroulait en Afrique m'a également permis de rencontrer des collègues d'Afrique du Sud et notamment Mélanie Chitray auprès de qui je souhaiterais me procurer trois virus SAT1, 2 et 3 dont la persistance différentielle en lien avec leur virulence différentielle a été démontrée. Ces virus pourraient être très intéressants à étudier sur le plan des IPP qu'ils établissent. Dans le cadre de la thèse PersIfA nous avons étudié les interactions établies par un virus de type O avec 16 protéines de la voie IFN-I bovines, porcines, caprines ou ovines mais la question se pose également en matière de sérotype. Ces interactions montrées pour la 3D du sérotype O sont-elles conservées pour des virus de sérotype SAT ?

Les points 1.1 à 1.4 pourront être mis en œuvre dans le cadre d'une thèse qui démarrerait en octobre 2024. Ce projet s'intitule précisément « Virus-Host Interactions in Foot-and-Mouth Disease Virus acute or persistent infection », acronyme « FMD-SCAPE ». J'ai déposé une demande de financement auprès de l'Anses début octobre 2023 pour réponse en février 2024. Je déposerai en parallèle une demande de labellisation du sujet par l'école doctorale ABIES pour pouvoir présenter un candidat pour concourir en juin 2024 pour un financement (complet ou demi selon le succès de l'appel Anses).

L'objectif principal du projet FMDV-SCAPE est de caractériser et de confirmer, dans un contexte infectieux, les interactions précédemment identifiées entre 3Dpol et sept protéines de la voie IFN, en se concentrant particulièrement sur l'interaction 3Dpol/MAVS. Cette spécificité de l'hôte mérite donc d'être étudiée plus avant, sachant que la persistance du virus de la fièvre aphteuse n'est décrite que chez les ruminants et non chez les porcs. La confirmation de l'interaction de 3Dpol avec IKKe, TRAF3 et NEMO, dans un contexte infectieux, sera poursuivie sur la base des résultats préliminaires et des protocoles optimisés au cours de la thèse PersIfA. Ces recherches seront ensuite menées dans le cas d'une infection aiguë mais aussi persistante en utilisant des cellules DSP bovines.

*En parallèle, un second objectif de ce projet FMD-SCAPE est d'appliquer l'approche interfactomique utilisée précédemment dans le projet PersIfA, à une espèce particulièrement intéressante en matière de persistance du virus de la fièvre aphteuse : le buffle africain (*Syncerus caffer*). Les buffles africains sont les principaux hôtes "porteurs" asymptomatiques du virus de la fièvre aphteuse. L'objectif sera donc de rechercher des interactions protéine-protéine (PPI) entre les seize protéines sélectionnées de la voie IFN-I du buffle africain et les 15 protéines virales de la fièvre aphteuse de type O, en utilisant le test de complémentation NanoLuc comme un criblage quantitatif à deux hybrides. En fonction de l'avancement du projet, ce travail pourrait être étendu aux protéines virales des trois sérotypes SAT-1, SAT-2 et SAT-3 des Territoires sud-africains. Il est intéressant de noter que les virus SAT-1 persistent plus longtemps que les virus SAT-2 et SAT-3, ce qui justifie la recherche d'antagonismes différentiels entre ces trois sérotypes et/ou en comparaison avec le sérotype O.*

1.5 Modulation thérapeutique de la persistance

Le projet FMDV_PersIfOmics se termine théoriquement fin mars 2024 mais j'ai demandé une prolongation

de 6 à 12 mois qui devrait être fort probablement accordée (pas de rallonge de budget demandée).

Dans le WP3 de ce projet, il est question de tester les effets de certaines molécules sur la persistance virale, suite aux conclusions du projet transcriptovac. Comme détaillé précédemment dans la partie I de ce manuscrit, nous avons procédé à une étude pilote pour tester l'effet du Ruxolitinib, un inhibiteur de la voie Jak/Stat sur la persistance du virus FMDV et une étude complémentaire est en cours.

Une autre molécule reste à tester : la trétinoïne, un dérivé de la vitamine A. Le choix de cette molécule vient des conclusions du projet transcriptovac et de l'approche « Ingenuity Pathway Analysis » (IPA) suite aux analyses protéomiques menées dans le cadre de ce projet, pour des cellules primaires bovines en stade d'infection aiguë versus persistante. Nous avons en effet précédemment démontré que les cytokératines, les collagènes et les laminines étaient régulés à la baisse dans les DSP bovines infectées de manière persistante par le virus de la fièvre aphteuse (33). Les cytokératines 5 et 14 sont exprimées dans la couche basale de l'épithélium kératinisé et la cytokératine 14 est considérée comme un marqueur des kératinocytes proliférants et non différenciés (37). Cela a conduit à suspecter que la persistance du FMDV affectait la mitose cellulaire et inhibait le renouvellement des cellules infectées de manière persistante. L'analyse IPA a indiqué que les œstrogènes et la trétionine (un dérivé de la vitamine A) pourraient avoir un effet sur ce modèle d'expression génique dans son ensemble, et sur l'expression de ces gènes en particulier. L'un des principaux effets des œstrogènes et de la trétionine est la stimulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires (38). Notre hypothèse est donc que l'ajout d'œstrogènes ou de vitamine A dans le milieu de culture des DSP bovines infectées par le virus de la fièvre aphteuse pourrait empêcher l'établissement et ou le maintien d'une infection persistante, grâce à l'induction de la mitose et de la prolifération des cellules du palais mou. L'ajout de ces molécules pourrait ainsi mettre fin à la persistance en stimulant le renouvellement des cellules infectées.

Ce projet sera le sujet de Master 2 de Candice Hodencq, pour la période janvier-juillet 2024 avec financement sur le projet PersIstOmics. Les cultures de cellules et infection se feront au SLU en suède puis à l'Anses Maisons-Alfort dans notre laboratoire FA et l'étudiant pourrait aller en mission au FLI en Allemagne pour la partie transcriptomique et RNAseq. Candice travaillera également sur le WP2 du projet FMDV_PersistOmics visant à mettre au point un test multiplex en RtpPCR ciblant des gènes candidats identifiés lors du projet précédent comme surexprimés dans le cas d'une infection persistante (données in vitro). Un prototype de test a déjà été développé par Caroline Michaud, chargée de projet de novembre 2021 à juin 2023. Il doit à présent être évalué sur la banque d'échantillons collectés par nos collaborateurs du SAP Institute d'Ankara en Turquie.

1.6 Modèles 3D in vitro pour étudier la physiopathologie du virus FA et les mécanismes de persistance

Grâce à notre collaboration avec nos collègues de Suède, Jean-François Valarcher et Sarah Hägglund nous avons pu développer un modèle d'infection persistante par le FMDV dans des cellules primaires issues de palais mou dorsal (DSP), cultivées à l'interface air liquide et mimant ainsi un épithélium stratifié. Ce modèle nous a permis d'étudier des signatures transcriptomiques de l'infection persistante, d'identifier des voies de signalisation régulées ainsi que des gènes différentiellement exprimés et même d'entreprendre des travaux visant à moduler la persistance in vitro.

Nous pourrions envisager de faire évoluer ce modèle en envisageant une approche explants et/ ou organoïde, ces derniers pouvant être maintenus de l'ordre de 150 jours en culture. C'est en toute honnêteté une technique de culture que je ne connais que très théoriquement mais notre UMR a déjà des collaborations avec Bertrand Pain (Inrae, Lyon) et nos collègues du SLU sont également en lien avec Fabienne Archer (Inrae, Lyon également). Je projette donc de prendre contact avec ces scientifiques expérimentés dans les prochains jours pour, toujours en lien avec nos collègues du SLU, nous lancer dans cette nouvelle aventure.

2. Diagnostic et surveillance de la fièvre aphteuse, du terrain au laboratoire

2.1 Evaluation du protocole LFD-INACT sur d'autres tests d'immunodétection

Le protocole d'envoi d'échantillons positifs pour la FA en utilisant des tests rapides d'immunodétection ou « LFD » après étape d'inactivation virale par traitement à l'acide citrique a été développé (39) puis évalué (Romey et al, 2023) en utilisant une référence de test LFD bien précise (Svanova, qui n'est hélas plus commercialisée depuis 2022). Avec le soutien de l'EuFMD toujours, nous avons le projet en cours d'évaluer ce protocole sur des tests LFDs alternatifs disponibles sur le marché et à terme sur des prototypes de test. L'idée serait même de pouvoir co-développer les tests LFD en incluant dans les coffrets de diagnostic, une solution d'acide citrique de concentration efficace et un papier pH pour contrôler le pH.

2.2 Optimisation des transfections d'ARN pour le « virus rescue »

Cet axe vient en complément du précédent, avec pour but d'optimiser les méthodes d'extraction des ARN à partir des bandelettes d'immunodétection des tests LFD et d'optimiser également les méthodes de transfection des ARN extraits pour produire les virus infectieux (« virus rescue »). Pour cela, nous pourrions aussi envisager d'établir des cellules ZZ-R127 (cellules épithéliales de langue de chèvres) surexprimant stablement le récepteur intégrine. Ce projet pourrait être mis en œuvre sur ressources propres de l'unité ou avec le soutien de l'EuFMD dans le cadre de leur appel à projet annuel.

2.3 Immortalisation de cellules DSP porcines à visée diagnostic

Dans le cadre de la thèse PersIFA, Morgan Sarry a isolé et caractérisé des cellules épithéliales primaires issues de palais mou de porc. Il a également montré que ces cellules étaient sensibles à différentes souches de virus FA ainsi qu'à d'autres virus importants pour le diagnostic différentiel (SVV et VSV) (Sarry et al, in press).

Je souhaiterais d'une part pouvoir isoler à nouveau des cellules DSP porcines pour les faire immortaliser par transgénèse selon la technologie développée par Inscreenex (40). Ces cellules constitueraient une nouvelle lignée pour le diagnostic de la fièvre aphteuse et le diagnostic différentiel notamment pour le SVV. Je souhaiterais également tenter à nouveau d'isoler des cellules épithéliales d'amygdales palatines qui sont des cellules sites d'infection primaire par le FMDV chez le porc.

Dans le cadre de l'appel à projet 2023/2024 du conseil scientifique de l'école vétérinaire d'Alfort J'ai demandé un financement pour ce projet intitulé « Modèles in vitro d'épithélium porcin pour l'étude de la pathogenèse et le diagnostic de la fièvre aphteuse » (Acronyme : EPI-FA-PIG). Ce projet n'a cependant pas été retenu pour financement. Je le garde à l'abri pour le resoumettre/l'amender si un autre AAP se présente auquel il puisse être éligible.

2.4 Marqueurs de persistance virale

Dans le cadre du projet FMDV_PersistOmics prolongé jusqu'en décembre 2024, le WP2 est consacré aux marqueurs diagnostique de l'infection persistante. Comme montré lors du précédent projet par notre équipe et nos collaborateurs, l'infection persistante en modèle DSP bovin IAL s'accompagne d'une réponse antivirale innée durable, mais diminuée et inefficace pour éliminer le virus. Des gènes cellulaires impliqués dans d'autres voies de signalisation sont également hautement régulés et pourraient servir de marqueurs de persistance.

Le WP2 vise à évaluer le potentiel de ces gènes candidats comme marqueurs diagnostiques hôtes de la persistance du FMDV. Pour cela, une RT-PCR en temps réel multiplex a été développée par Caroline Michaud, chargée de projet recrutée sur le projet, pour détecter à la fois les gènes candidats précédemment identifiés LY6E et FBP1) et un marqueur épithélial comme contrôle endogène (l'occludine). Le prototype de test multiplex a été mis au point et sera évalué par une cinétique d'expression au cours de l'infection sur des échantillons in vitro et ex vivo, puis sur une banque d'échantillons cliniques collectés en Turquie courant 2021 lors d'épidémies de FA, toujours au sein de ce même projet. Ce test permettrait de diagnostiquer de façon robuste voire prédire la persistance du FMDV chez les ruminants, et ainsi contribuer à un meilleur contrôle de la FA. Caroline ayant interrompu son contrat en juin 2023, cette partie du projet sera reprise notamment dans le cadre du stage Master 2 de Candice Hodencq.

3. Nouveaux vaccins contre la fièvre aphteuse et tests diagnostiques compagnons

3.1 Vaccins chimériques FMDV/BRBV

Dans le cadre du projet SPIDVAC (2022-2025), nous allons, dès fin 2023, initier en collaboration étroite avec le FLI, les constructions et productions de virus chimériques dans le but de produire des candidats vaccins basés sur des virus qui soient des chimères aphtovirales atténuées (41). De tels vaccins recombinants seront ainsi des vaccins DIVA (Differentiating infected from vaccinated animals).

3.2 Tests diagnostiques compagnons

Toujours dans le cadre de ce projet Spidvac, le but sera de développer en parallèle les tests de diagnostic sérologique compagnons des vaccins développés. Nous avons déjà commencé à développer un prototype de test Elisa basé sur la protéine non structurale 2B.

Ces projets s'inscrivent aussi dans le programme de travail du mandat LRUE fièvre aphteuse détenu par notre

laboratoire avec le soutien du département de santé vétérinaire de Boehringer-Ingelheim avec qui nous avons signé une convention de collaboration.

CONCLUSION

La force de notre équipe au sein de l'UMR virologie est de combiner activités de référence, surveillance et diagnostic et recherche plus amont/fondamentale. Recherche et référence se nourrissent l'une de l'autre dans une dynamique positive et enthousiasmante. De plus, nos mandats nous mettent en relation avec de nombreux laboratoires dans le monde et nous maintiennent en lien étroit avec la réalité de la maladie sur le terrain et ses conséquences socio-économiques en zones d'endémie. En cela cette recherche nous engage, voire nous « oblige » au plan scientifique mais également humanitaire, dans la transmission, l'aide et la formation en direction des pays touchés qui mêlent souvent instabilité politique, économique et épizooties de fièvre aphteuse aux conséquences dévastatrices. En ce sens c'est aussi ce qui m'anime dans les projets de recherche que je propose, rédige et dirige et/ou auquel je participe.

Je continuerai bien naturellement à œuvrer et m'impliquer dans les activités et projets du LRUE fièvre aphteuse et en tant que virologue de garde, à être disponible pour la cellule alerte fièvre aphteuse. Pour assurer la continuité des travaux scientifiques hors LRUE, je continuerai à répondre aux appels à projets pertinents pour nos thématiques et notamment la thématique persistance et interactions FMDV-hôtes. En cela je maintiendrai nos collaborations existantes et en développerai d'autres.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mangeney M, Heidmann T. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 déc 1998;95(25):14920-5.
2. Bénit L, Dessen P, Heidmann T. Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol*. déc 2001;75(23):11709-19.
3. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 15 févr 2001;409(6822):860-921.
4. Grandi N, Tramontano E. Type W Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) Integrations and Their Mobilization by L1 Machinery: Contribution to the Human Transcriptome and Impact on the Host Physiopathology. *Viruses*. 27 juin 2017;2017:162.
5. de Parseval N, Lazar V, Casella JF, Benit L, Heidmann T. Survey of Human Genes of Retroviral Origin: Identification and Transcriptome of the Genes with Coding Capacity for Complete Envelope Proteins. *Journal of Virology*. oct 2003;77(19):10414-22.
6. Malassiné A, Blaise S, Handschuh K, Lalucque H, Dupressoir A, Evain-Brion D, et al. Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells. *Placenta*. 1 févr 2007;28(2):185-91.
7. Malassiné A, Frendo JL, Blaise S, Handschuh K, Gerbaud P, Tsatsaris V, et al. Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology*. 23 janv 2008;5:6.
8. Mangeney M, Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, et al. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 déc 2007;104(51):20534-9.
9. Buchrieser J, Degrelle SA, Couderc T, Nevers Q, Disson O, Manet C, et al. IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast formation and promote fetal demise. *Science*. 12 juill 2019;365(6449):176-80.
10. Blaise S, de Parseval N, Heidmann T. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology*. 14 mars 2005;2:19.

11. Cardenas MC, Farnan S, Hamel BL, Mejia Plazas MC, Sintim-Aboagye E, Littlefield DR, et al. Prevention of the Vertical Transmission of HIV; A Recap of the Journey so Far. *Viruses*. avr 2023;15(4):849.
12. Johnson EL, Chakraborty R. HIV-1 at the placenta: immune correlates of protection and infection. *Curr Opin Infect Dis*. juin 2016;29(3):248-55.
13. Spector SA. Mother-to-infant transmission of HIV-1: the placenta fights back. *J Clin Invest*. févr 2001;107(3):267-9.
14. Tang Y, Woodward BO, Pastor L, George AM, Petrechko O, Nouvet FJ, et al. Endogenous Retroviral Envelope Syncytin Induces HIV-1 Spreading and Establishes HIV Reservoirs in Placenta. *Cell Reports*. 31 mars 2020;30(13):4528-4539.e4.
15. Bosch A, Gkogka E, Le Guyader FS, Loisy-Hamon F, Lee A, van Lieshout L, et al. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int J Food Microbiol*. 20 nov 2018;285:110-28.
16. Duizer E, Koopmans M. Tracking emerging pathogens: the case of noroviruses. *Emerging Foodborne Pathogens*. 2006;77-110.
17. Enkirsch T, Eriksson R, Persson S, Schmid D, Aberle SW, Löf E, et al. Hepatitis A outbreak linked to imported frozen strawberries by sequencing, Sweden and Austria, June to September 2018. *Euro Surveill*. 11 oct 2018;23(41):1800528.
18. Perelle S., Blaise-Boisseau Sandra. Virus entériques et aliments. *Revue générale du froid & du conditionnement d'air*. févr 2007;
19. Blaise-Boisseau S, Hennechart-Collette C, Guillier L, Perelle S. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *Journal of Virological Methods*. 1 juin 2010;166(1):48-53.
20. Perelle S, Cavellini L, Burger C, Blaise-Boisseau S, Hennechart-Collette C, Merle G, et al. Use of a robotic RNA purification protocol based on the NucliSens easyMAG for real-time RT-PCR detection of hepatitis A virus in bottled water. *J Virol Methods*. avr 2009;157(1):80-3.
21. Deboosere N, Pinon A, Delobel A, Temmam S, Morin T, Merle G, et al. A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A virus in acidified berries. *Food Microbiol*. oct 2010;27(7):962-7.
22. Deboosere N, Pinon A, Caudrelier Y, Delobel A, Merle G, Perelle S, et al. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiol*. oct 2012;32(1):48-56.
23. Santé publique France. SURVEILLANCE DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES (TIAC) DONNÉES DE LA DÉCLARATION OBLIGATOIRE, 2021. Le point épidémiol. 2023; Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2021(Février 2023).
24. Sarry M, Romey A, Lefebvre D, Benfrid S, Dufour B, Durand B, et al. [Foot and mouth disease virus: transmission, pathogenesis, diagnosis and surveillance]. *Virologie (Montrouge)*. 1 sept 2022;26(5):355-73.
25. Fracastorius, H. De sympathia et antipathia rerum liber unus. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione Libri III. Vol. Vol. Liber I. Venecia- Italia: Heirs of L. Giunta; 1546.
26. Sarry M, Vitour D, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model. *Viruses*. 27 sept 2022;14(10):2129.
27. Hammond JM, Maulidi B, Henning N. Targeted FMD Vaccines for Eastern Africa: The AgResults Foot and Mouth Disease Vaccine Challenge Project. *Viruses*. 14 sept 2021;13(9):1830.
28. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 3.1.8: Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease virus). Available online:

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf (accessed on 11 April 2022).
In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Internet]. 2021. Disponible sur: Available online:
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf

29. Sánchez-Matamoros A, Beck C, Kukiélka D, Lecollinet S, Blaise-Boisseau S, Garnier A, et al. Development of a Microsphere-based Immunoassay for Serological Detection of African Horse Sickness Virus and Comparison with Other Diagnostic Techniques. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2016;63(6):e270-7.
30. Breard E, Garnier A, Despres P, Boisseau SB, Comtet L, Viarouge C, et al. Development of a Double-Antigen Microsphere Immunoassay for Simultaneous Group and Serotype Detection of Bluetongue Virus Antibodies. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2017;64(6):1837-47.
31. Kopliku L, Relmy A, Romey A, Gorna K, Zientara S, Bakkali-Kassimi L, et al. Establishment of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection in MDBK cells. *Arch Virol*. oct 2015;160(10):2503-16.
32. Häggglund S, Laloy E, Näslund K, Pfaff F, Eschbaumer M, Romey A, et al. Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate. *Transbound Emerg Dis*. janv 2020;67(1):133-48.
33. Pfaff F, Häggglund S, Zoli M, Blaise-Boisseau S, Laloy E, Koethe S, et al. Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus. *Viruses* [Internet]. 12 janv 2019 [cité 6 août 2020];11(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356718/>
34. Sarry M, Caignard G, Dupré J, Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, et al. Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway. *Viruses*. mars 2023;15(3):666.
35. Sarry M, Bernelin-Cottet C, Michaud C, Relmy A, Romey A, Salomez AL, et al. Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2023 [cité 12 oct 2023];14. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1215347>
36. Glanzmann B, Möller M, le Roex N, Tromp G, Hoal EG, van Helden PD. The complete genome sequence of the African buffalo (*Syncerus caffer*). *BMC Genomics*. 7 déc 2016;17:1001.
37. Perželová V, Sabol F, Vasilenko T, Novotný M, Kováč I, Slezák M, et al. Pharmacological activation of estrogen receptors- α and - β differentially modulates keratinocyte differentiation with functional impact on wound healing. *Int J Mol Med*. janv 2016;37(1):21-8.
38. Gudas LJ, Wagner JA. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol*. févr 2011;226(2):322-30.
39. Romey A, Relmy A, Gorna K, Laloy E, Zientara S, Blaise-Boisseau S, et al. Safe and cost-effective protocol for shipment of samples from Foot-and-Mouth Disease suspected cases for laboratory diagnostic. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(1):197-204.
40. Lipps C, Klein F, Wahlicht T, Seiffert V, Butueva M, Zauers J, et al. Expansion of functional personalized cells with specific transgene combinations. *Nat Commun*. 8 mars 2018;9:994.
41. Uddowla S, Pacheco JM, Larson C, Bishop E, Rodriguez LL, Rai DK, et al. Characterization of a chimeric foot-and-mouth disease virus bearing a bovine rhinitis B virus leader proteinase. *Virology*. déc 2013;447(1-2):172-80.

WEBOGRAPHIE

https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_fr.pdf
<https://viralzone.expasy.org/98>