

Présentation des projets financés au titre de l'édition 2010 du
 Programme « Mécanismes Intégrés de l'Inflammation »

ACRONYME et titre du projet	Page
ATHLO : Athérombose et organes lymphoïdes tertiaires adventitiels : physiopathologie et potentiel clinique	2
GEMISA : GENétique, Microbiote, Inflammation, et Spondylarthrite Ankylosante	4
GROVI : La régulation de l'intégrité vasculaire par les GPCRs	6
IgA-ToIDC : Cellules dendritiques tolérogènes induites par les IgA sécrétoires : applications thérapeutiques anti-inflammatoires	7
IMPRO-Fprau : Analyse des effets immuno-modulateurs des peptides issus d'une protéine spécifique de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , une bactérie commensale impliquée dans la maladie de Crohn	8
INFLAFER : Mécanismes de l'anémie inflammatoire : interférences entre inflammation et métabolisme du fer	10
iNKT-SAP : Analyse des voies de signalisation SLAMF-R-SAP dans les mécanismes régulant l'inflammation via la production d'IL-17: implication des cellules iNKT et des lymphocytes T	12
iSa : Biologie intégrative de la signalisation intracellulaire par les immunorécepteurs dans l'inflammation allergique	14
MigreFlame : Infiltration tissulaire des macrophages et inflammation : identification d'inhibiteurs de la migration cellulaire en trois dimensions	16
PATHIMMUN : Les pathogènes nous enseignent de nouvelles stratégies antiinflammatoires	18
PPARolePGE2 : Relation PPAR-PGE2 dans l'inflammation chronique : une possibilité de contrôler l'athérombose ?	20
PurPID : Signalisation par les récepteurs purinergiques: vers l'identification de cibles thérapeutiques dans les maladies inflammatoires pulmonaires	22
TLR9 in inflammation : Transport intracellulaire/signalisation du TLR9 et son rôle dans l'inflammation	24
ZebraFlam : Signaux et cellules de la réponse inflammatoire: suivi en temps réel chez un vertébré entier, le danio zébré	26

ATHLO Athérothrombose et organes lymphoïdes tertiaires adventitiels : physiopathologie et potentiel clinique

Résumé

L'athérothrombose est une maladie inflammatoire chronique et représente la première cause de mortalité dans le monde malgré de grand progrès thérapeutiques. L'immunobiologie de l'athérothrombose est notre sujet d'étude depuis de nombreuses années. Plusieurs équipes, dont la notre, ont récemment décrit la formation d'organes lymphoïdes tertiaires (TLOs) dans les artères soumises à une inflammation chronique, et notamment dans l'adventice des artères athérotrombotiques. Il s'agit d'une découverte majeure car au sein de ce tissu lymphoïde ectopique, des effecteurs immunitaires pathogènes s'activent et mûrissent in situ, des processus que l'on pensait être restreints aux organes lymphoïdes secondaires (SLOs). Cette découverte offre un nouveau paradigme et soulève de nouvelles questions : i) Est-ce que les réponses immunitaires générées dans les TLOs adventitiels influencent l'évolution de la maladie ? Si les effecteurs immunitaires générés dans les TLOs adventitiels sont dirigés contre des éléments de la paroi vasculaire, la néogenèse lymphoïde devrait accélérer la destruction du vaisseau. Cette hypothèse sera testée à l'aide d'approches expérimentales permettant de moduler la formation des TLOs. ii) Quels sont les mécanismes qui président à la genèse des TLOs adventitiels ? En nous basant sur nos données dans d'autres conditions inflammatoires, nous formulons l'hypothèse que la formation des TLOs récapitule le programme développemental de l'organogenèse des SLOs. Ceci requiert une interaction entre cellules lymphoïdes "inductrices" et cellules stromales "organisatrices". Nous identifierons les cellules jouant le rôle de cellules inductrices et organisatrices dans le contexte de l'athérothrombose et nous caractériserons les facteurs initiant le processus. iii) Quelles sont les applications cliniques de ce nouveau concept ? Nous sommes actuellement dans l'incapacité de prédire le destin des artères athérosclérotiques. Etant donné que la néogenèse lymphoïde évolue de manière concomitante à la maladie athérotrombotique, nous proposons que la formation des TLOs pourrait constituer un marqueur pronostic. De plus, comprendre comment les TLOs influencent la maladie nous fournira de nouvelles pistes thérapeutiques. Ainsi, nous mettrons au point des techniques

d'imagerie moléculaire non invasives et nous testerons des outils interventionnels thérapeutiques dans des modèles précliniques. Ce projet repose sur une vision intégrée du processus inflammatoire athérombotique. La combinaison de l'expertise des deux partenaires portant sur l'ontogenèse des tissus lymphoïdes (G Eberl, Partenaire 2) et sur l'immunopathologie vasculaire (A Nicoletti, Partenaire 1) offre l'opportunité de redessiner le cadre de travail de l'immunobiologie des pathologies athérombotiques. De plus, ce projet a des objectifs translationnels avec l'évaluation préclinique de nouvelles options pronostiques et thérapeutiques.

Partenaires Hemostasis, Bio-engineering and Cardiovascular Remodelling
- U698 Hôpital Bichat
Institut Pasteur

Coordinateur Antonino NICOLETTI
antonino.nicoletti@inserm.fr

Aide de l'ANR 490 000 €

Début et durée Mars 2011 – 36 mois

Référence ANR-10-MIDI-001

GEMISA GEnétique, Microbiote, Inflammation, et Spondylarthrite Ankylosante

Résumé

La spondylarthrite ankylosante (SpA) est un exemple de maladie inflammatoire chronique fréquente (0,3% de la population adulte française) extrêmement invalidante et ayant une forte prédisposition génétique, dont l'association extrêmement forte à l'allèle HLA-B27 est la mieux établie. Des données récentes à la fois génétiques et immunologiques orientent vers un mécanisme de l'inflammation faisant intervenir la voie Th-17 et plus particulièrement des anomalies de l'interaction entre cellules dendritiques et lymphocytes T CD4+. De nombreux arguments plaident par ailleurs pour un rôle du microbiote intestinal dans la pérennisation de la réponse inflammatoire chronique au cours de la SpA. L'objectif principal de notre projet est d'étudier de façon approfondie les interactions entre les gènes, la réponse immunitaire et le microbiote intestinal au cours de cette affection pour en déduire un schéma physiopathologique cohérent. Pour cela nous nous appuyerons sur les résultats récents d'une étude de liaison pan-génomique que nous avons réalisée dans 154 familles multiplex de SpA, à l'aide de puces Affymetrix de haute densité (250 kSNP) et qui nous a permis de localiser 3 nouvelles régions génomiques de susceptibilité à la SpA sur les chromosomes 6p11-q11, 13q13 et Xqter (LOD scores entre 4,38 et 5,94). Nous réaliserons une cartographie d'association intrafamiliale de ces régions par leur criblage dense à l'aide de tag-SNPs, ce qui nous permettra de réduire la taille des intervalles de susceptibilité (tâche 1). Cette stratégie sera couplée à une étude de l'expression différentielle des gènes et exons contenus dans chaque région entre patients et germains sains pour identifier les gènes associés à la SpA (tâche 2), que nous séquencerons pour identifier les polymorphismes génétiques causaux (tâche 3). Ces résultats seront validés par des études de réplication dans d'autres cohortes de patients et de témoins obtenues par des collaborations (tâche 3). En parallèle, nous séquencerons l'ADN (métagénomique) et les ARNm (métatranscriptomique) du microbiote intestinal des patients familiaux et de leurs germains sains. Les variations de la composition et de l'activité transcriptionnelle du microbiote seront analysées en corrélation avec les données immunogénétiques pour en déduire un schéma physiopathologique complet de la SpA (tâche 4). Nous modéliserons les interactions entre tous les facteurs

généétiques de susceptibilité à la SpA, en incorporant les données résultant de l'étude de la composition et de l'activité transcriptionnelle du microbiote intestinal, de façon à en déduire les voies de l'inflammation impliquées (tâche 5). Enfin, des algorithmes génétiques de prédiction diagnostique seront établis et testés dans une cohorte multicentrique française dédiée, la cohorte ECHOSPA, et dans la cohorte GAZEL, représentative de la population générale (tâche 6).

Partenaires INSERM, INSTITUT COCHIN DEPARTEMENT IMMUNO-HEMATO
INRA
INSERM

Coordinateur Maxime BREBAN
maxime.breban@apr.aphp.fr

Aide de l'ANR 1 020 000 €

Début et durée Décembre 2010 - 48 mois

Référence ANR-10-MIDI-002

Programme « Mécanismes Intégrés de l'Inflammation »

Edition 2010

GROVI La régulation de l'intégrité vasculaire par les GPCRs

Résumé

L'enflure est une caractéristique de l'inflammation et le reflet de la fuite du plasma et de cellules des vaisseaux sanguins en des endroits où l'endothélium est rendu perméable. Bien qu'elle soit importante pour l'extravasation de cellules immunes recrutées pour parer à l'invasion des pathogènes, l'ouverture excessive et/ou prolongée des jonctions endothéliales peut devenir une composante destructive de réponses inflammatoires exubérantes et quelques fois injustifiées. L'analyse des mécanismes qui régulent l'intégrité vasculaire pourrait à la fois aider à comprendre pourquoi son équilibre est rompu au cours de l'inflammation et faciliterait la manipulation ciblée de l'intégrité vasculaire. Nous étudions les familles de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui régulent la fonction des barrières endothéliale et épithéliale dans la réponse aux serine protéases et aux sphingolipides bioactifs qui sont tous les deux abondants aux sites de l'inflammation. Dans ce projet, nous cherchons à mieux comprendre la capacité de ces récepteurs à réguler les interactions cellulaires, le mécanisme par lequel ils exercent ces effets, et avant tout, quand et pourquoi ils sont engagés pour moduler la barrière vasculaire dans les processus physiologiques et physiopathologiques. Pour ce faire, nous allons combiner des techniques de biologie cellulaire, de génétique et des modèles murins de développement vasculaire et d'inflammation vasculaire locale ou systémique. Des études de biologie du développement et de maladies chez l'adulte seront menées en parallèle. Nous espérons que les leçons apprises de la façon dont un système de signalisation dirige le développement du système vasculaire, va nous aider à améliorer notre approche sur la manière dont ce dernier est ré-engagé durant le challenge inflammatoire au cours de la vie adulte.

Partenaires

INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center (PARCC)- Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP)

Coordinateur

Eric CAMERER
eric.camerer@inserm.fr

Aide de l'ANR

432 496 €

Début et durée

Janvier 2011 - 48 mois

Référence

ANR-10-MIDI-003

IgA-ToIDC Cellules dendritiques tolérogènes induites par les IgA sécrétoires : applications thérapeutiques anti-inflammatoires

Résumé

Le traitement des maladies autoimmunes reste problématique car la thérapeutique a peu évolué depuis deux décennies malgré l'utilisation de quelques biothérapies comme des anticorps monoclonaux (mAb) anti-CD20 ou anti-TNF. L'utilisation de corticoïdes et d'immunosuppresseurs comme traitement conventionnel a une efficacité limitée et est accompagnée par l'induction d'effets secondaires indésirables. Il est donc important de développer de nouvelles approches thérapeutiques à l'aide de molécules immunorégulatrices pour prévenir le développement et traiter les maladies autoimmunes. Dans ce projet, nous testerons l'efficacité des IgA sécrétoires (IgAS) pour inhiber l'activation du système immunitaire par la modulation de la maturation des cellules dendritiques (CD). Les CD conditionnées en présence des IgAS (CD-IgAS) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et produisent de grande quantité d'interleukine (IL)-10. A l'aide de modèles animaux, nous avons montré que ces CD-IgAS bloquent le développement de pathologies autoimmunes spécifiques d'organes comme le diabète autoimmun et l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale. Nous proposons de caractériser les mécanismes moléculaires qui inhibent la maturation des CD et induisent leur production d'IL-10. Nous souhaitons définir les mécanismes cellulaires inhibant le développement des pathologies autoimmunes à l'aide de plusieurs modèles murins de pathologies autoimmunes. Notre projet correspond à des études précliniques pour valider l'utilisation des CD-IgAS dans le traitement des maladies autoimmunes.

Partenaires

INSERM U699
INSERM U986

Coordinateur

Renato MONTEIRO
renato.monteiro@inserm.fr

Aide de l'ANR

423 063 €

Début et durée

Décembre 2010 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-010

IMPRO-Fprau Analyse des effets immuno-modulateurs des peptides issus d'une protéine spécifique de *Faecalibacterium prausnitzii*, une bactérie commensale impliquée dans la maladie de Crohn

Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale caractérisée par une inflammation chronique focale et transmurale de la muqueuse intestinale dont la physiopathologie reste inconnue. Elle met en jeu des mécanismes complexes de dialogue entre la réponse du système immunitaire de sujets génétiquement prédisposés et certains produits du microbiote intestinal. Nous avons récemment montré que : i) un taux faible au niveau iléal de *Faecalibacterium prausnitzii* (bactérie commensale appartenant au phylum des Firmicutes) était prédictif de la récurrence post-opératoire de la MC et que ii) cette bactérie possédait des propriétés anti-inflammatoires importantes à la fois dans des modèles in vitro de cellules épithéliales en culture et dans un modèle murin de colite inflammatoire. Notre groupe a ainsi réussi à déterminer que l'effet anti-inflammatoire de *F. prausnitzii* était lié à une (ou plusieurs) molécules présentes dans le surnageant de culture bloquant l'activité NF- κ B et la sécrétion d'IL-8 et stimulant la sécrétion d'IL-10. L'analyse comparée du surnageant de *F. prausnitzii* et de son milieu de culture par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence la présence de 7 peptides dans des fractions du surnageant reproduisant l'effet immunomodulateur du surnageant total. La caractérisation de ces peptides a montré qu'ils provenaient tous d'une seule et même protéine d'environ 15kD synthétisée par *F. prausnitzii* et dont la fonction et la structure sont inconnues. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'effet immunomodulateur du surnageant de *F. prausnitzii* observé est dû à ces peptides/protéine. A partir de cette hypothèse, avec laquelle nos résultats préliminaires s'accordent, nous proposons de développer un projet scientifique centré sur la compréhension des mécanismes des effets immuno-modulateurs portés par ces peptides et cette protéine. Les compétences de 3 laboratoires (ER7 UPMC Seksik, MICALIS INRA Langella, UMRS7203 Lavielle) seront réunies pour la conduite de ce travail selon des approches complémentaires en microbiologie, biologie cellulaire, biochimie et chimie. Nous proposons un programme en plusieurs tâches : tâche 1

consacrée à la production de la protéine par une bactérie hétérologue et génétiquement modifiée (*L. lactis*) et la validation de ses effets immunomodulateurs sur modèles cellulaires et animaux ; tâche 2 dévolue à la synthèse des peptides issus de cette protéine, leur criblage sur modèle cellulaire en fonction de leurs effets immunomodulateurs et la validation des effets de peptides d'intérêt sur modèles animaux de colites ; tâche 3 consacrée à l'analyse structure-fonction de la protéine et des peptides à la recherche des sites d'action et des partenaires cellulaires ; tâche 4 destinée à la description des voies de signalisation de l'inflammation impliquées dans les effets immunomodulateurs ; tâche 5 consacrée à une étude clinique sur la détection des peptides et de la protéine dans les selles de patients atteints de MC. Les deux premières tâches permettront d'asseoir le rôle immunomodulateur des peptides/protéine spécifiques de *F. prausnitzii* et de fournir des quantités suffisantes de molécules pour la réalisation de la tâche 3. Cette dernière en lien avec la tâche 4 permettra de décrire sur un plan moléculaire les mécanismes d'action impliqués dans cet effet immunomodulateur. Enfin au cours de la tâche 5, nous explorerons chez l'homme l'intérêt de l'utilisation de nouveaux outils pronostiques potentiels que constituent ces peptides/protéine issus de *F. prausnitzii*. L'ensemble constitue un programme de recherche original et cohérent centré sur des molécules bio-actives issues d'une bactérie commensale impliquée dans la pathogénie d'une maladie inflammatoire chronique intestinale. Ce projet pourrait déboucher sur le développement de nouvelles approches dans la prévention et le contrôle de l'inflammation intestinale.

Partenaires

Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, ER7 UPMC Micro-organismes et physiopathologie intestinale
INRA
UPMC UMR 7203

Coordinateur

Philippe SEKSIK
philippe.seksik@sat.aphp.fr

Aide de l'ANR

450 000 €

Début et durée

Février 2011 - 24 mois

Référence

ANR-10-MIDI-014

INFLAFER Mécanismes de l'anémie inflammatoire : interférences entre inflammation et métabolisme du fer

Résumé

Au cours de l'inflammation, la sortie du fer des macrophages est inhibée par une production excessive d'hépcidine par le foie et la rate. Les mécanismes moléculaires en jeu sont encore mal définis. L'hépcidine se fixe sur la ferroportine, le seul exportateur de fer connu à ce jour, et provoque son internalisation et sa dégradation, inhibant ainsi la sortie du fer des cellules de stockage. Dans un deuxième temps, l'inflammation réprime le messenger de la ferroportine par un mécanisme qui est inconnu. Cet état paradoxal, où les stocks en fer sont abondants mais la production de globules rouges faible, conduit à l'anémie inflammatoire, aussi connue sous le nom d'anémie des maladies chroniques. Comprendre comment l'inflammation induit la synthèse d'hépcidine et la répression du messenger de la ferroportine est crucial car un nombre très important de patients souffrant d'infections, de cancers, ou de maladies auto-immunes présente une anémie inflammatoire, ce qui accroît considérablement la morbidité de la maladie sous-jacente. Notre projet a donc pour but de mieux comprendre les voies moléculaires impliquées dans la séquestration du fer dans les macrophages lors des maladies inflammatoires et de mettre en évidence les cibles moléculaires qui permettraient de développer des traitements plus efficaces que ceux actuellement disponibles. Les bouleversements du métabolisme du fer induits par l'inflammation sont le résultat de régulations complexes qui ont lieu dans plusieurs organes, en particulier l'intestin, la rate et le foie, et peuvent impliquer différents types cellulaires à l'intérieur d'un même tissu. Pour modéliser ces régulations, les expériences in vitro sur des cellules cultivées en dehors de leur contexte physiologique ne permettent pas une vue globale du système et des études in vivo chez la souris sont indispensables. Un des points forts de ce projet repose sur l'utilisation de souris KO Bmp6 chez lesquelles le mécanisme de régulation de l'hépcidine par le fer est complètement abrogé en raison de l'absence de Bmp6. Ces souris conservent leur capacité à induire l'hépcidine en réponse à un stimulus inflammatoire et sont un outil précieux pour étudier les interférences entre inflammation et métabolisme du fer. Notre programme de travail est subdivisé en quatre tâches. Brièvement, nous induirons une inflammation par du LPS chez

des souris KO Bmp6 et nous établirons précisément la chronologie de l'évolution des profils de cytokines sécrétées, des paramètres martiaux, des niveaux d'expression de gènes codant des molécules classiquement impliquées dans la voie de signalisation BMP/Smad, des niveaux de phosphorylation des effecteurs Smad, et des ARNm et de l'expression protéique de différentes molécules impliquées dans le métabolisme du fer, notamment la ferroportine. Nous disséquons ensuite les différentes étapes qui induisent la synthèse d'hepcidine via un stimulus inflammatoire, en particulier l'inhibition de la voie de régulation de l'hepcidine par le fer (répression des messagers de l'hémojuvéline et de la ferroportine), l'activation de la cascade de signalisation BMP/Smad par un ligand encore inconnu mais que nous identifierons, et enfin l'influence de la vitamine A sur l'activation de la voie de signalisation IL-6/Stat3. A chaque étape, nous testerons des cibles potentielles pour le développement de nouveaux traitements de l'anémie inflammatoire. Les deux partenaires impliqués dans ce projet ont des expertises complémentaires dans la génétique de la souris, les études d'expression génique, incluant des études à large échelle à l'aide de puces à ADN (partenaire 1), et le macrophage et les études de protéines (partenaire 2). Ils ont tous les deux une très bonne connaissance du métabolisme du fer et ont récemment démontré l'importance de Bmp6 dans la régulation du métabolisme du fer. La mise en commun de leurs efforts mutuels sera essentielle au décryptage des mécanismes conduisant à l'anémie inflammatoire.

Partenaires

INSERM-U563, Hôpital CHU Purpan, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP)
INSERM U563

Coordinateur

Marie-Paule ROTH
marie-paule.roth@inserm.fr

Aide de l'ANR

442 452 €

Début et durée

Janvier 2011 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-004

iNKT-SAP Analyse des voies de signalisation
SLAM-R-SAP dans les mécanismes régulant
l'inflammation via la production d'IL-17:
implication des cellules iNKT et des lymphocytes T

Résumé

Notre projet a comme objectif principal de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires des processus inflammatoires impliquant les lymphocytes iNKT et les voies de signalisations SLAM-R/SAP. L'inflammation est un processus complexe régulé par les réponses immunes innées et acquises qui s'avère essentiel pour la protection de l'individu envers des agents nocifs comme des pathogènes, des cellules endommagées ou d'irritants. Toutefois, quand incontrôlée, cette réponse devient pathologique. Pour cette raison, l'inflammation est strictement régulée par une action en concert des réponses immunes innée et adaptative. Parmi les cellules T régulatrices et les facteurs capables d'influencer ce processus, nous pouvons mentionner les cellules iNKT (pour invariant Natural Killer T), l'IL-17 et les voies de signalisations impliquant les récepteurs de la famille SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) et les molécules SAP (SLAM-associated protein). Ces voies SLAM-R/SAP jouent un rôle critique dans plusieurs réponses immunes où les cellules T, B et NK sont impliquées. De plus, SAP est strictement nécessaire pour le développement des cellules iNKT. Ces cellules produisent rapidement et massivement des cytokines de type Th1, Th2 et Th17 comme l'IFN- γ , l'IL-4 et l'IL-17. Par ces moyens, les cellules iNKT peuvent constituer un pont entre l'immunité innée et acquise et réguler le devenir de plusieurs réponses immunes inflammatoires. En conséquence, les cellules iNKT sont considérées comme des « couteaux suisse » du système immunitaire et doivent ainsi être finement régulées. Dans ce contexte, nos résultats récents montrent que SAP régule la capacité des cellules iNKT à produire de l'IL-17. Compte tenu que cette cytokine joue un rôle essentiel dans l'inflammation, nous pouvons faire l'hypothèse que la voie SLAM-SAP peut influencer les réponses inflammatoires en agissant sur la production d'IL-17. Dans ce projet, nous proposons de disséquer ce nouveau mécanisme capable d'influencer les réponses inflammatoires. Pour cela, nous réaliserons des études *in vitro* pour déterminer les mécanismes moléculaires impliqués et utiliserons des modèles murins expérimentaux *in vivo* d'inflammation pulmonaire. Ces études seront aussi étendues

à l'homme par l'analyse de lymphocytes humains de sujets sains et de patients déficients pour SAP. Les résultats obtenus devraient permettre l'identification de nouveaux mécanismes capables d'influencer la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires et potentiellement proposer des nouvelles approches thérapeutiques. Trois équipes internationalement reconnues dans le domaine des cellules iNKT, SLAM-SAP et ROR-gammat (le facteur critique pour la production d'IL-17) joindront leurs efforts pour réaliser le présent projet : Partner 1 (coord): Maria Leite-de-Moraes et collaborateurs, CNRS UMR8147, Hôpital Necker, Paris Partner 2: Sylvain Latour et collaborateurs, INSERM 768, Hôpital Necker, Paris Partner 3: Gérard Eberl et collaborateurs, Institut Pasteur, Paris.

Partenaires

CNRS
INSERM
Institut Pasteur

Coordinateur

Maria LEITE DE MORAES
maria.leite-de-moraes@parisdescartes.fr

Aide de l'ANR

476 668 €

Début et durée

Décembre 2010 - 48 mois

Référence

ANR-10-MIDI-005

iSa Biologie intégrative de la signalisation intracellulaire par les immunorécepteurs dans l'inflammation allergique

Résumé

L'activation des cellules responsables de l'inflammation allergique est contrôlée par des récepteurs membranaires. Les signaux complexes qui résultent de l'engagement de tels récepteurs par des ligands extracellulaires plurivalents sont intégrés par des complexes multimoléculaires – les signalosomes – qui se constituent de manière transitoire au niveau de la partie intra-cytoplasmique de ces récepteurs. L'objectif de notre projet est d'étudier à l'aide d'approches de Biologie intégrative la composition et la dynamique des signalosomes associés au récepteur de forte affinité pour les IgE (RFceI). Ce récepteur est exprimé à la surface des mastocytes et est à la base des réactions allergiques. Nous nous proposons d'identifier au sein de cette voie de signalisation des nœuds de communication particulièrement vulnérables à l'action de composés pharmacologiques. Les avancées dont à fait l'objet la spectrométrie de masse permettent d'analyser l'ensemble des molécules associées à un moment donné à une molécule-appât d'intérêt. Ces molécules-appâts sont modifiées à l'aide d'une séquence reconnue par un anticorps ou par la streptavidine de façon à pouvoir être « capturée » par chromatographie d'affinité dans un lysat cellulaire. Ces molécules-appâts sont généralement exprimées par transfection dans des lignées cellulaires transformées maintenues en culture. Cependant, la miniaturisation récente de ces techniques d'affinity purification mass spectrometry (AP-MS) les rends transposables à l'étude de petites quantités de cellules primaires. Notre projet vise donc à combiner ces nouvelles approches d'AP-MS avec la construction d'un panel de 12 lignées de souris knock-in dont chacune exprimera en quantité physiologique une molécule-appât impliquée dans la voie de signalisation opérée par le RFceI. Des cultures primaires de mastocytes seront établies à partir de chacune des souris knock-in et après avoir été stimulé à l'aide de ligands physiologiques du RFceI, les signalosomes s'assemblant autour de chacune de ces molécules appâts à différents temps d'activation seront isolés de manière native et soumis à des analyses protéomiques et phosphoprotéomiques. En parallèle, une nouvelle technique d'imagerie appelée « nanoscopie » sera utilisée afin de

déterminer avec une haute résolution spatiale la distribution et la concentration subcellulaires des molécules-appâts. Les données quantitatives déduites des approches de spectrométrie de masse et de nanoscopie seront alors intégrées dans un modèle mathématique permettant de simuler l'activation des mastocytes par les allergènes. Ce projet implique 5 équipes ayant une expertise reconnue dans le domaine de la génétique de la souris, de l'activation des cellules du système immunitaire, de l'allergie, de la protéomique, de l'imagerie biologique à haute résolution et de la modélisation mathématique. L'intégration de ces 5 équipes autour du présent projet résultera en une « boîte à outils » totalement unique permettant de comprendre avec une résolution inégalée les mécanismes fondamentaux qui contrôlent l'activation des cellules effectrices de l'allergie. Ce projet constitue donc un réel défi technologique que nous pensons, compte tenu des expertises réunies, être à même de relever. Il devrait fournir des informations inédites permettant de comprendre, et donc de manipuler à terme à l'aide de composés pharmacologiques, la nature des "machines moléculaires » qui déterminent le comportement d'un acteur cellulaire majeur de l'allergie. Seule une telle approche de « Biologie intégrative » permettra de comprendre comment l'information se propage à l'intérieur d'une cellule avec une haute résolution temporelle, et de prédire le comportement des cellules impliquées non seulement dans l'allergie, mais aussi dans d'autres pathologies inflammatoires, dont la fréquence a augmenté au cours des 30 dernières années. .

Partenaires

Parc Scientifique de Luminy
Centre d'Immunologie de
Marseille-Luminy (CIML)
INSERM AMC
INSERM EDyP
INSERM
INSERM

Coordinateur

Bernard MALISSEN
bernardm@ciml.univ-mrs.fr

Aide de l'ANR

986 207 €

Début et durée

Décembre 2010 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-006

MigreFlame Infiltration tissulaire des macrophages et inflammation : identification d'inhibiteurs de la migration cellulaire en trois dimensions

Résumé

L'infiltration tissulaire des macrophages joue un rôle majeur dans le développement de maladies inflammatoires chroniques en participant à l'apparition de graves dommages tissulaires. Les macrophages infiltrent également les tumeurs solides où ils jouent un rôle majeur dans la progression et l'invasion tumorale. Ainsi, l'inhibition spécifique de l'infiltration tissulaire des macrophages constitue une nouvelle stratégie thérapeutique. Le défi est maintenant d'identifier les molécules jouant un rôle clé dans le recrutement tissulaire de cette sous-population de leucocytes. Il est clair aujourd'hui que l'environnement extracellulaire rencontré par les macrophages au cours de leur migration dans un tissu est organisé en trois-dimensions (3D) et pourtant, les mécanismes moléculaires mis en jeu sont à ce jour peu connus. L'équipe 1 vient de montrer que la tyrosine kinase, Hck, spécifiquement exprimée dans les phagocytes, contrôle la migration des macrophages en 3D in vitro et in vivo et que les macrophages peuvent adopter les modes de migration mésenchymal ou amiboïde. De plus, les macrophages sont classifiés en sous-types polarisés M1 ou M2 selon l'environnement tissulaire rencontré mais leur capacité migratoire n'a jamais été étudiée à ce jour. L'action concertée de deux groupes travaillant sur la biologie des macrophages (Equipe 1: I. Maridonneau-Parini, CNRS UMR5089 Toulouse; et équipe 3: J.L. Mège, CNRS UMR6236 Marseille) avec une équipe spécialisée dans le criblage à haut débit (Equipe 2 : B. Déprey, Inserm U761 Lille) et un partenaire industriel ayant une longue expérience dans l'utilisation de modèles inflammatoires chez la souris (Ambiotis) validera Hck comme cible pharmacologique. Nous identifierons des inhibiteurs de Hck et proposerons de nouvelles cibles pharmacologiques spécifiquement impliquées dans la migration en 3D des macrophages. Enfin, nous caractériserons l'impact de la polarisation des macrophages sur leurs propriétés migratoires en 3D. Pour valider Hck en tant que cible pour l'inhibition de l'infiltration tissulaire des macrophages, nous comparerons, dans des souris wt versus hck^{-/-}, le recrutement des macrophages dans les tissus au cours d'inflammations aiguë (péritonite) ou chronique (colite) et du développement de

tumeurs expérimentales, ainsi que les phases d'évolution et/ou de résolution de ces maladies. En parallèle, des inhibiteurs de Hck seront identifiés par une stratégie associant un criblage haut-débit et un développement moléculaire à partir d'un pharmacophore. La spécificité de ces molécules envers Hck et leurs effets sur la migration 3D in vitro seront déterminés. Pour identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration 3D des macrophages et proposer de nouvelles cibles pharmacologiques, une approche par transcriptomique différentielle permettra de comparer les profils d'expression de gènes de macrophages humains migrant en 2D versus 3D ou en mode mésenchymal versus amiboïde. Le rôle de gènes candidats spécifiquement impliqués dans la migration 3D sera confirmé par ARN interférants et/ou par l'étude des souris KO correspondantes. Pour caractériser le rôle de la polarisation M1/M2 sur la migration 3D des macrophages, plusieurs sous-populations de macrophages murins et humains seront étudiées par des tests de migration 3D, soit après différenciation in vitro, soit après leur isolement à partir de tissus murins ou de patients. En conclusion, les résultats attendus contribueront à un défi majeur dans la recherche de drogues anti-inflammatoires 1) en validant Hck comme cible pour de futures stratégies anti-inflammatoires, 2) en identifiant des inhibiteurs pharmacologiques de Hck et 3) de nouveaux candidats potentiellement impliqués dans la migration 3D des macrophages. Ils apporteront en plus des éléments de réponses concernant les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'infiltration tissulaire des macrophages et l'impact de la polarisation M1/M2 des macrophages sur ce processus.

Partenaires

CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS)
Université de la Méditerranée Aix Marseille 2-URMITE
INSERM U761-BDM

Coordinateur

Isabelle MARIDONNEAU-PARINI
Isabelle.maridonneau-Parini@ipbs.fr

Aide de l'ANR

459 035 €

Début et durée

Mars 2011 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-013

PATHIMMUN Les pathogènes nous enseignent de nouvelles stratégies antiinflammatoires

Résumé

Les bactéries pathogènes, soumises à une forte pression sélective afin d'éviter les réactions immunes inflammatoires de l'hôte infecté et afin d'achever un processus efficace de colonisation et d'invasion, ont accumulé au cours de leur longue co-évolution avec les primates supérieurs, une variété de gène codant pour des protéines impliquées dans des mécanismes « anti-immunité » très efficaces. Les pathogènes bactériens entéroinvasifs comme *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia*, qui représentent les différents types d'interaction possible (intracellulaire, extracellulaire) avec l'épithélium intestinal et les cellules immunes résidentes ou recrutées de la lamina propria, possèdent une grande variété d'effecteurs qui sont injectées dans le cytoplasme de la cellule cible via un appareil de sécrétion spécialisé (TTSS). Ensemble, ces effecteurs représentent une « mine d'or » de stratégies – et par conséquent d'idées – pour manipuler et contrôler les voies du système immunitaire qui coopèrent pour éradiquer le microorganisme invasif. Qu'ils soient innés ou adaptatifs, les mécanismes immunitaires de la cellule hôte convergent dans les cellules clés (monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T de type Th1 et Th17) produisant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires et des chemokines qui recrutent et activent les cellules phagocytaires au prix d'un dommage massif pour les tissus. L'analyse moléculaire et cellulaire du mode d'action de ces effecteurs « anti-immunité » révèle qu'ils sont en général des enzymes capables d'entraîner des modifications des fonctions des protéines hôtes qui représentent – ou appartiennent à – des points de contrôle des cascades pro-inflammatoires (I- κ B, IKK, ERK/P38, etc...). Les activités enzymatiques varient d'ubiquitine ligases à deubiquitinases, de kinases à phosphatases ou à phosphothréonine lyases, méthylases, etc.... Ces enzymes sont dédiés à l'atténuation des voies NF- κ B et MAPKinases, que l'on peut considérer comme attendues, et par conséquent moins disposées à produire des cibles originales pour le développement de nouvelles drogues anti-inflammatoires. Un autre effecteur injecté par le TTSS, IpgD, est une phosphatidylinositol phosphatase qui hydrolyse le PI(4,5)P2 en PI5P. Nous avons récemment montré, dans des modèles expérimentaux d'infection par *Shigella*, qu'IpgD exprime le plus fort effet anti-inflammatoire. Nos données préliminaires indiquent qu'à travers la perte de PI(4,5)P2, ou

plutôt l'apparition du PI5P, un phosphoinositide encore malconnu, IpgD interfère de façon extrêmement efficace avec des mécanismes cellulaires variés, qui tous ensemble contribuent à ces fortes fonctions "anti-immunité, et particulièrement anti-inflammatoire. Ces mécanismes peuvent être classés en catégories qui sont la base de nos quatre objectifs pour ce projet : (i) la régulation des signaux de danger par la fermeture des hémicanaux qui régulent le relargage d'ATP pro-inflammatoire induit par les cellules épithéliales envahies; (ii) le contrôle efficace des flux de Ca²⁺ induit par les signaux d'invasion émis par la bactérie, l'inhibition de ces flux participant à la régulation de l'ouverture des hémicanaux; (iii) la régulation de l'activation du récepteur EGF et son recyclage, dont la fonction peut ne pas être essentielle pour réguler l'inflammation, mais peut servir comme modèle pour étudier comment IpgD affecte la fonction et l'exposition à la surface de récepteurs clés de l'immunité; (iv) le contrôle de la migration cellulaire via les modifications de la dynamique du cytosquelette des cellules de l'immunité. A partir de cette dissection très basique du mode d'action anti-inflammatoire d'IpgD, nous souhaitons identifier de possibles cibles originales afin de définir de nouvelles stratégies anti-inflammatoire.

Partenaires

INSTITUT PASTEUR
INSERM
INSERM

Coordinateur

Philippe SANSONETTI
philippe.sansonetti@pasteur.fr

Aide de l'ANR

499 842 €

Début et durée

Décembre 2010 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-007

PPARolePGE2 Relation PPAR-PGE2 dans l'inflammation chronique : une possibilité de contrôler l'athérombose ?

Résumé

L'inflammation chronique de la paroi artérielle en réponse au dépôt de lipides qui s'oxydent entraîne la formation de plaques d'athérosclérose. La complication majeure de cette pathologie inflammatoire est l'athérombose, responsable de la plupart des accidents cardiovasculaires. Les traitements anti-plaquetaires utilisés pour prévenir l'infarctus du myocarde inhibent la thrombose, mais sont limités par leur effet hémorragique. Nous avons montré que l'inflammation chronique de la plaque produit de la prostaglandine E2 (PGE2) en quantité suffisante pour potentialiser l'athérombose sans interférer avec l'hémostase. Mais la voie qui contrôle cette production de PGE2 dans la plaque n'est pas connue. Les PPARs sont des récepteurs nucléaires impliqués dans des mécanismes contrôlant l'action de plusieurs eicosanoïdes et certaines études cliniques suggèrent que l'activation de PPARγ par la rosiglitazone augmente le risque d'accident cardiovasculaire, bien que ces données soient contredites. Notre objectif global est de déterminer si une voie fonctionnelle PPAR-PGE2 existe dans la plaque d'athérosclérose, qui permettrait de moduler la production de PGE2 et éventuellement de prévenir l'athérombose. Notre premier objectif est de tester pharmacologiquement et in vitro si un PPAR contrôle la production de PGE2 dans les macrophages. Nos résultats préliminaires montrent que la rosiglitazone qui active PPARγ a augmenté la production de PGE2. Nous testerons sa spécificité en reproduisant l'expérience en présence d'un inhibiteur spécifique de PPARγ. Cette première approche sera confirmée en inhibant l'expression de PPARγ dans les macrophages par la transfection de siRNA. Notre deuxième objectif testera si la voie PPARγ/PGE2 est fonctionnelle in vivo, dans les plaques. Nous mesurerons l'expression des PPARs dans la plaque mature; nos données préliminaires montrent que l'expression de PPARγ y est prédominante. Nous traiterons des souris par la rosiglitazone afin d'en étudier l'impact sur la production de PGE2 dans les plaques. Nos résultats seront confirmés en utilisant une lignée de souris dans laquelle l'expression de PPARγ n'est invalidée que dans les macrophages et de façon inducible pour ne pas interférer avec le développement des plaques. Notre troisième objectif explorera le rôle de la PGE2

dans les plaques, qui peut être pro- ou anti-inflammatoire. Nous étudierons par une démarche fonctionnelle si la PGE2 est capable de « reprogrammer » des macrophages pour qu'ils répondent à une sollicitation inflammatoire en produisant des molécules anti-inflammatoires comme la lipoxine LXA4. Nous confirmerons cette propriété en comparant la production de LXA4 dans les plaques qui sont capables ou non de produire de la PGE2 (lignée invalidée pour la mPGES-1, et croisée avec les souris ApoE-/-). Notre dernier objectif est de tester l'effet de la manipulation de la voie PPARg-PGE2 sur l'athéromatose. Si la PGE2 a un rôle résolutif, l'inhibition de sa production par la stimulation de PPARg pourrait modifier la stabilité de la plaque. Nous évaluerons donc l'effet de la rosiglitazone sur la vulnérabilité des plaques (histologie et microscopie électronique à balayage) et sur leur thrombogénicité (modèle d'athéromatose établi dans notre laboratoire). Notre programme de recherche établira ainsi si PPARg dans les plaques contrôle la voie de la PGE2, si la PGE2 a un rôle résolutif, et examinera les effets de la rosiglitazone sur les plaques. Ce dernier point est important en regard des données cliniques contradictoires sur la toxicité cardiovasculaire de cette molécule largement utilisée dans le traitement du diabète. Notre travail pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans la prévention de l'athéromatose.

Partenaires

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CERBM
CERBM

Coordinateur

Jean-Etienne FABRE
jefabre@igbmc.fr

Aide de l'ANR

386 800 €

Début et durée

Janvier 2011 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-011

Label pôle

Alsace Biovalley (ex Innovations thérapeutiques)

PurPID Signalisation par les récepteurs purinergiques: vers l'identification de cibles thérapeutiques dans les maladies inflammatoires pulmonaires

Résumé

L'inflammation est un mécanisme fondamental de défense du système immunitaire contre l'infection mais aussi la destruction cellulaire, permettant ainsi la réparation des tissus endommagés et le retour à une situation physiologique. Cependant, une inflammation non contrôlée peut être la cause de l'aggravation de la maladie, voir être à l'origine de la pathologie, ceci aboutissant au développement de maladies auto-inflammatoires ou auto-immunes. L'inflammation joue un rôle important dans les maladies pulmonaires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou la fibrose pulmonaire, les cellules recrutées au niveau des tissus produisant des médiateurs de l'inflammation tels que des chimiokines et des cytokines. Ces processus conduisent à une réparation tissulaire anormale et /ou à la destruction des tissus. Récemment, a été découvert l'inflammasome NLRP3, complexe protéique intracytoplasmique dont l'activation conduit à la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukin-1beta (IL-1b) (Martinon et al., 2009). Cette découverte a été faite grâce à l'étude de maladies auto-inflammatoires rares provoquées par différentes mutations dans le récepteur NLRP3 conduisant à l'activation constitutive de l'inflammasome NLRP3 et la production en excès d'IL-1b. L'inflammasome NLRP3 et l'IL-1b constituent la pierre angulaire de nombreuses pathologies inflammatoires (Martinon and Tschopp, 2004; McGonagle et al., 2007). Nous avons montré le rôle essentiel de l'IL-1b et de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation provoquée par l'agression des tissus pulmonaires (Gasse et al., 2007; Gasse et al., 2009). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'inflammation pulmonaire conduisant à la fibrose est absolument requise afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette maladie pour laquelle il n'existe aucun traitement efficace. Nous proposons d'étudier les mécanismes de l'inflammation provoquée par l'agression des poumons à différents niveaux: au niveau de l'organisme entier par l'étude expérimentale chez la souris, au niveau tissulaire sur des biopsies de patients, au niveau cellulaire avec des lignées cellulaires de souris, d'origine

humaine ou de patients et enfin au niveau moléculaire par la recherche de partenaires protéiques des voies de signalisation des récepteurs cellulaires impliqués dans l'inflammation. L'objectif de ce projet est de déterminer si l'ATP extracellulaire est un signal de danger libéré en réponse à l'agression pulmonaire, alertant ainsi le système immunitaire et conduisant à l'inflammation et la fibrose pulmonaire à travers la production d'IL-1 β . Ce programme sera focalisé sur l'étude du rôle de la signalisation purinergique et en particulier celui des récepteurs P2X7 et P2X4, de la pannexin-1 dans l'inflammation provoquée par l'ATP. Les voies de signalisation intracellulaires reliant les P2XR à un phénotype inflammatoire seront identifiées à travers la combinaison des modèles moléculaires, cellulaires et de modèles intégratifs. En parallèle, la caractérisation de ATP en tant que signal de danger endogène induit et/ou libéré par les cellules mourantes sera adressée par l'utilisation de matériel clinique obtenu de patients présentant une fibrose pulmonaire idiopathique (IPF). L'analyse de l'expression des P2XR et de molécules associées à l'inflammation dans les poumons des patients atteints de fibrose pulmonaire interstitielle sera effectuée. Enfin, ce programme pourrait non seulement permettre de valider les récepteurs purinergiques comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'inflammation pulmonaire, mais aussi d'identifier de nouvelles cibles de signalisation potentielles en aval de ces récepteurs.

Partenaires

Immunologie et Embryologie Moléculaires (IEM), CNRS
Université de Rennes 1 UMR991
CNRS UMR 5203

Coordinateur

Isabelle COUILLIN
couillin@cncrs-orleans.fr

Aide de l'ANR

481399

Début et durée

Janvier 2011 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-012

TLR9 in inflammation Transport intracellulaire/signalisation du TLR9 et son rôle dans l'inflammation

Résumé

Les récepteurs Toll (TLRs) reconnaissent des motifs moléculaires (ligands) uniquement présents chez les microorganismes pathogènes dénommés PAMPs pour "Pathogen-Associated Microbian Pattern". Les récepteurs TLR3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques et sont localisés dans les endosomes/lysosomes des cellules hôtes telles que les cellules dendritiques (CDs), les macrophages et les cellules épithéliales. La stimulation des TLRs par les PAMPs est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire conduisant à la sécrétion de cytokines pro inflammatoires, à l'expression de molécules de co-stimulation et à la maturation des cellules dendritiques (CDs) qui interviennent dans l'induction de l'immunité adaptative. Récemment, il a été montré que le TLR9 doit être clivé pour devenir fonctionnel. Notre équipe a démontré que l'asparagine endopeptidase (AEP), protéase endosomale, est indispensable pour l'activation et la signalisation des TLR endocytiques dans les cellules dendritiques. En effet, les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes déficientes pour cette protéase montrent une forte réduction de sécrétion de cytokines pro inflammatoires suite à la stimulation du TLR9 par son ligand in vitro et in vivo. Le TLR9 une fois activé va migrer du réticulum endoplasmique vers les compartiments endosomaux où il sera clivé sous l'action de l'AEP pour générer un fragment correspondant à son extrémité C-terminale. C'est cette forme clivée qui s'associe avec la molécule adaptatrice MyD88 permettant ainsi la transduction du signal. En conclusion, nos résultats identifient l'AEP comme une enzyme clé jouant un rôle essentiel dans la signalisation des TLRs endosomaux. Le TLR9 reconnaît l'ADN de nombreux pathogènes et de ce fait joue un rôle important dans les processus inflammatoires. En effet, nous avons établi que les souris déficientes pour le gène du TLR9 sont plus sensibles à l'infection par *Leishmania major*, parasite infectant un grand nombre d'individus dans le monde. Les CDs n'exprimant pas le TLR9 ne sont plus activées par le parasite et ne sont plus capables de générer une réponse T de type Th1. De même, le TLR 9 semble jouer aussi un rôle dans un modèle inflammatoire induit par la bactérie *P. aeruginosa*, cause majeure de mortalité dans les infections pulmonaires.

Nos résultats préliminaires montrent que les cellules dendritiques déficientes pour l'AEP infectées par *L. major* se comportent comme les cellules n'exprimant plus le TLR9, et sont incapables de produire des cytokines pro inflammatoires en réponse à *L. major*. Egalement, les macrophages alvéolaires déficients pour le gène de l'AEP ne sont pas tués par *P. aeruginosa*. Le but de ce projet est de mettre en place des modèles in vivo d'infection bactérienne et parasitaire impliquant la reconnaissance des TLR endocytiques chez ces souris déficientes pour l'AEP afin de pouvoir tester l'importance de cette protéase dans ces maladies et également d'étudier la régulation fine du trafic de ces TLRs endosomaux et de la protéine chaperon UNC93B1. La perspective finale du projet est de déterminer dans quelle mesure la modulation de l'activité de l'AEP permettrait une amélioration d'une réponse immunitaire dirigée contre certains pathogènes. Les protéases endosomales constituant d'excellentes cibles pharmacologiques, cette étude pourra également ouvrir de nouvelles possibilités de traitement des maladies inflammatoires. En effet, nous disposons d'un inhibiteur chimique utilisable in vivo.

Partenaires INSERM U932, Institut Curie
Institut Pasteur
Institut Pasteur

Coordinateur Bénédicte MANOURY
benedicte.manoury@curie.fr

Aide de l'ANR 496 082 €

Début et durée Janvier 2011 – 36 mois

Référence ANR-10-MIDI-008

ZebraFlam Signaux et cellules de la réponse inflammatoire: suivi en temps réel chez un vertébré entier, le danio zébré

Résumé

Le danio zébré (*Danio rerio*, ou zebrafish), un modèle animal classique de la biologie du développement, est également très bien adapté à l'étude des interactions hôte-pathogène. Sa larve est petite, transparente et supporte très bien une anesthésie prolongée, ce qui la rend très bien adaptée aux méthodes d'imagerie in vivo non invasives. Elle est également aisée à manipuler génétiquement, et dispose d'une immunité innée robuste mettant en jeu des types cellulaires et des cytokines similaires à ceux des mammifères. Il représente donc un outil de choix pour l'analyse de la dynamique spatio-temporelle des réponses inflammatoires. Nous avons déjà développé des systèmes de visualisation par fluorescence des infections virales chez le danio in vivo et, par ailleurs, nous avons créé une lignée de danios transgéniques nous permettant de suivre la production du principal interféron responsable de la réponse antivirale innée. La combinaison de ces deux outils a permis de montrer qu'il était possible de suivre en temps réel la propagation d'une infection virale dans un organisme vertébré entier, et d'observer simultanément le développement de la réponse de l'hôte, à une résolution où les cellules individuelles sont identifiables. L'objectif de notre projet est d'étendre cette approche à une analyse fine de la réponse inflammatoire induite au cours de diverses situations infectieuses. En plus des virus, nous intégrerons à notre analyse le pathogène naturel du danio *Mycobacterium marinum*, une bactérie très apparentée à *M. tuberculosis* et qui induit chez le danio une maladie aux caractéristiques physiopathologiques très proches de celles de la tuberculose humaine. Des mutants de *M. marinum* présentant des défauts de production de certains composants de la paroi cellulaire ou de facteurs impliqués dans la survie intracellulaire seront générés par génétique inverse. Le rôle potentiel de ces molécules dans la modulation de la réponse inflammatoire pourra ainsi être établi. Les différents composants de la réponse de l'hôte - attraction des leucocytes, phagocytose, formation de granulomes, production de cytokines - seront suivis par microscopie en temps réel. Par ailleurs, nous analyserons les conséquences de la voie d'entrée des bactéries sur la réponse de l'hôte -en parallèle avec l'étude de bactéries entrant par voie naturelle- ainsi que la réponse

inflammatoire causée par des biofilms et lors d'une vaccination génique. Ces études feront appel à la génération de nouvelles lignées de danio transgéniques, basées sur des rapporteurs fluorescents. En plus des productrices d'IFN, ces lignées nous permettront de suivre en temps réel les cellules productrices de TNF α et d'IL10; ainsi que les cellules répondant à ces trois cytokines inflammatoires. Les cellules sources d'IL8 seront également identifiées de cette manière. Nous développerons également les outils nous permettant de manipuler la réponse inflammatoire, par des approches de gain ou de perte de la réponse aux cytokines, ainsi que par l'ablation spécifique des principales sous-populations de leucocytes innés. Afin de compléter nos études microscopiques, nous réaliserons une analyse globale des variations du transcriptome induites lors de la phase précoce d'une infection virale ou par *M. marinum*, et déterminerons la part jouée par la réponse aux IFNs, au TNF α et à l'IL-10. Un modèle du réseau des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire du danio sera déduit de cette analyse. De par son approche intégrée, ce projet aboutira à une dissection des réponses inflammatoires à un niveau de résolution encore inégalé, et probablement à la description de phénomènes encore insoupçonnés. Ces résultats seront largement applicables à la compréhension de l'inflammation chez l'homme, et auront des applications potentielles pour le criblage de drogues anti-inflammatoires ou la formulation rationnelle des adjuvants.

Partenaires

Macrophages et Développement de l'Immunité (MDI), Institut Pasteur
CNRS - DAA
INRA - VIM
CNRS - DIMNP
IP - UGB

Coordinateur

Jean-Pierre LEVRAUD
jean-pierre.levraud@pasteur.fr

Aide de l'ANR

729 301€

Début et durée

Décembre 2010 - 36 mois

Référence

ANR-10-MIDI-009