

# EVALUATION DE LA PROTEINE VP7 POUR LA PROTECTION DES OVINS VIS-A-VIS DU VIRUS BLUETONGUE (BTV) LORS D'UN ESSAI VACCINAL UTILISANT LE VECTEUR POXVIRUS SG33

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2009  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Agathe, Laura CARUSO**  
Née le 6 mars 1983 à Albi (81)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Gilles FOUCRAS**

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jacques IZOPET**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Gilles FOUCRAS**  
**M. Gilles MEYER**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.  
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*  
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*  
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*  
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*  
M. SAUTET Jean, *Anatomie*  
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

Mme BÉNARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*  
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Pharmacologie et Thérapeutique*  
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*  
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*  
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Réproduction, Endocrinologie*  
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*  
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*  
M. PICAVET Dominique, *Pathologie infectieuse*  
M. SANS Pierre, *Productions animales*  
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

### INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique Equine*
- M. REYNOLDS Brice, *Médecine, Ophtalmologie*

### PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
- M SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

### MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

### MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
- M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
- Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
- M MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants.*
- Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie Chirurgicale*
- M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
- Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
- Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
- Mme TROGELER-MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*
- M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

### MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle BUCK-ROUCH, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
- M. DOUET Jean-Yves, *Ophtalmologie*
- M. SEGUELA Jérôme, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. VERSET Michaël, *Chirurgie des animaux de compagnie*

### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
- M. GIN Thomas, *Production et pathologie porcine*
- M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction*
- M. RABOISSON Didier, *Productions animales*
- Mlle TREVENNEC Karen, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

# REMERCIEMENTS

**A notre président de thèse,**

**A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Virologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Hommages respectueux.

**A notre jury de thèse,**

**A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie des ruminants*

Qui nous a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,  
Pour son soutien, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse,  
Sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur Gilles MEYER**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie des ruminants*

Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse,  
Sincères remerciements.



# DEDICACES

## **A Kunthea**

Qui a eu la gentillesse et la patience de m'encadrer dans l'élaboration de ce travail,  
Pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son aide précieuse.

A nos épisodes loufoques avec les moutons, à tes talents de contention du mouton, à nos bons moments Ficoll...

Je te souhaite beaucoup de bonheur et toute la réussite que tu mérites !

Mille mercis !

## **A Béa**

Qui a eu la gentillesse et la patience de me guider au début de ce travail,  
Sincères remerciements.

## **Aux Martines**

Pour leur aide et leur gentillesse,  
Sincères remerciements.

## **A Christian et Cécile**

Pour leur aide quand il a été question de jouer les mamans mouton,  
Sincères remerciements.

## **Au personnel technique de la plate forme d'infectiologie expérimentale du centre de recherche de Tours-Nouzilly**

Qui a participé à la réalisation de l'épreuve virulente,  
Sincères remerciements.

## **A Jean-Sébastien Viville**

Qui a réalisé le suivi clinique des animaux et les prélèvements lors de l'épreuve virulente,  
Sincères remerciements.

## **A mon statisticien**

Merci Laurent...





### **A Bon-Papa**

Cette thèse est pour toi. Toi qui m'as initiée au plaisir d'apprendre. « Maître corbeau sur un arbre perché... » ça ne s'oublie pas. Tu es toujours là dans mon cœur et ta flamme guide mes pas dans les grands moments... J'espère que tu es fier...

### **A mes Parents**

Merci semble un bien petit mot...

Merci de m'avoir toujours soutenue : depuis mes premiers galops à Poney en passant par la dure période de la prépa jusqu'à aujourd'hui.

Merci de m'avoir toujours offert la possibilité de réaliser mes rêves.

Merci d'avoir cru en moi.

Parce que vous êtes toujours là. Parce qu'avec vous rien ne me fait peur. Parce que vous êtes un exemple à suivre.

Vous êtes tout simplement merveilleux.

Je vous aime.

### **A mon Frère Raphaël**

Toi qui sais me remettre dans le droit chemin quand il faut...

A tous nos beaux souvenirs d'enfance : bagarres, fauteuil, « dis bonsoir Kévin »... j'en passe et des meilleures. A ton « son », ta GQ attitude et tes petites manies que j'aime tant !

Je te souhaite toute la réussite et le bonheur du monde.

Merci, je t'adore et t'admire.

### **A Laurie**

A ta bonne humeur contagieuse. Continue de rendre mon frère heureux.

### **A Mamée**

Le bruit délicat de tes bagues qui s'entrechoquent, la délicieuse odeur qui s'évade de ta cuisine, la chaleur de tes étreintes autant de petits bonheurs qui ont bercé mon enfance et dont le souvenir est si doux. Merci pour ton amour ma fougueuse Mamée. Je n'aspire qu'à te ressembler.

### **A Papie et Mamie**

Vous qui m'avez transmis votre passion des animaux et de la nature. Merci pour votre amour.

### **A tonton Eric**

Parce que la vie est injuste, ...

### **A la famille Azaïs**

Encore merci pour votre accueil au Québec.

### **A mes oncles, tantes**

A tous ces beaux noëls et autres fêtes passées en famille.

### **A mes cousins, cousines**

A nos parties de cache-cache endiablées, aux espions, au ski, ... autant de bon moments partagés qui ont rendu notre enfance si heureuse...

### **Aux familles Varès et Pascuito**

Merci pour votre accueil et votre soutien.



### **A Fabouch**

Kitchen 80, les esthéticiennes, les étés piscine et Carrapicho, « agence BFA bonjour »...  
Quoi qu'il arrive tu es toujours à mes côtés... Je t'adore ma Sinecou !

### **A Elodie**

Fidèle depuis le collège,... on en a fait du chemin depuis l'exposé chocolat et la langue feu!

### **A Virginia**

A nos élans de vulgarité, à ton démaquillage si inédit, à ta musicalité, à la radio dans les endroits les plus insolites.

Vive cascada et surtout le comptoir de la pièce détachée nantais ! (T'inquiète, il doit être bien le comptoir de la pièce détachée de mayennais !)

Je n'aurais qu'un mot : chhhèèèèèè !!!!!!!

### **A son algue : Marc**

Non les pruneaux c'est pas breton!

### **A Emilie**

Depuis le méga bécher, les choses ont changé mais tu es toujours là...

A nos soirées vétotel, à notre téléphone addict attitude qui fait tellement de bien !

Je te souhaite beaucoup de réussite dans le défi que tu t'es lancé !

### **A Pépée**

A nos craquages séminériens, à nos fouinasseries, à nos repas de crasses intempestifs, à ta joie de vivre, aux sushis, à Cora...

Parce que ça n'a été que bonheur et fous rires cette année à tes côtés !

### **A Strina**

Je ne sais pas quoi choisir... il faudrait faire un choix entre ta bonne humeur, tes smoothies, ton Partner, ta jalousie... Merci à toi toute entière !

### **A mes co-internes**

#### **Pépée, Laurence, Johanne, Julie, Jeanne, Guillaume, Myriam**

Parce que sans vous l'internat n'aurait pas eu le même goût ! Une team de rêve !!!! A notre salle des internes, la seule et l'unique ! A notre découverte commune du froid et de la neige, à nos soirées de traitement, à nos soirées Bouffon... Parce que j'ai aimé travailler et apprendre avec vous tous. Vous me manquez en hostie !!!

### **A mes chers résidents**

#### **Julie, Peggy, Michaël**

Merci pour tout ce que vous m'avez appris, parce que grâce à vous je sais quel véto j'aspire à devenir...

A Dire Straits, Tétette et la grosse plaquette de Lindt...

Julie revient vite dans notre beau pays lire Elle en sirotant un petit verre de Tariquet.

M.... aux deux futurs boardés !

### **A Bep**

A ta passion pour la bovine, ta finesse en toutes circonstances, tes talents de danseur surtout sur Mika. Parce qu'on a bien rit cette année là en TP !

Ca fait toujours du bien de discuter avec toi !

### **A Lucile et Guillaume**

A la balade des chiens, au romantisme, au ramassage de crottins (contente que tu aies changé de passion Lucile...). Je vous souhaite beaucoup de bonheur tous les deux, une jolie maison et une belle clinique !

P.S : Cixie je t'aime !

### **A Huche**

Parce qu'en fait tu me poursuis depuis le lycée...Et c'est tant mieux parce que je passe toujours des bons moments en ta compagnie !

### **A Pipit**

Parce que finalement je t'ai toujours éclaté en HIDAOA ! Allez sans rancune ! Profite bien des States !

### **A Camille**

A ces quelques bons mois passés en T1 à tes côtés. Aux pauses « tea and potins » dans le bureau... Non je ne critique pas, j'observe !

Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille !

### **A Isa et Mathilde**

A un bel été au Québec et beaucoup de plaisir de vous retrouver en France.

### **A Marion**

Aux soirées pâtes carbo et potins post-Equinoxe.

### **A Marie**

Nos chemins se sont écartés mais je garde un très bon souvenir de ces années d'école partagées avec toi.

### **A toutes les belles rencontres québécoises**

**Racla** et tes kystes ovariens, **Benito** (ou Boris) même si tu fais de la concurrence à Roger, **Sandra** (et oui tu es une rencontre québécoise !), **Laureline**, **Leen**, **Nicolas**, **Brrre**, **Christine** membre active du fan club de Hugh Jackman, **Suzie**, **Normand**, **Joe**, j'en passe et des meilleures ... merci pour cette belle année !

### **Aux amis de prépa**

Parce que même si c'était dur, grâce à vous j'en garde de bons souvenirs.

**Sum** président tout désigné de l'association de libération du Lot-et-Garonne, **Manue** parce que maintenant je sais qu'il faut peler les marrons..., **Bichon** the best Bizu ever, **Ronsard** compagnon de connerie et co-perturbateur de Momo, **Fanny**, **Flo**, **Delphine**, **Jujul**, **Sébastien** sacré co-bi, **Psy**, **Bousse** ou porcinet pour les intimes, **Crado**, **Alex**, **Patrick**.

### **A tous mes maîtres de stage**

#### **Au corps enseignant du secteur équin du CHUV de Montréal**

Qui ont su m'inculquer le goût de notre beau métier. Qui savent si bien conjuguer passion et travail bien fait !

### **A tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas...**

**A vous tous qui m'avez aidé à réaliser mon rêve**

Parce que grâce à votre soutien j'ai la chance de savoir ce que ça fait d'être heureuse en partant travailler le matin...

**A Polka , Néness, Billou et Ploomy**

Tout a commencé avec vous...



## A Laurent

Par où commencer...

Toi qui es toujours là, dans les meilleurs moments comme les moins bons.  
Toi qui me donne la force et me soutiens : depuis l'adaptation au milieu aérien... en passant  
par les agneaux et le Québec, jusqu'à demain...

L'avenir nous appartient et il nous sourit... Puisse ton rêve se réaliser...  
A tes ploomerries, tes hérissoneries, ... Autant de pitreries qui me font tant rire !  
A tous ces bons moments passés ensemble et à tous nos bonheurs futurs...

On va l'avoir cette cabane au fond du jardin !

A toi sans qui rien n'aurait été possible...

J'ai tellement de chance de t'avoir à mes côtés !

Comme le dit un grand auteur :

« Pas besoin de rimes en fleur, de métaphores, de grand discours... »

Merci

« ... »

*« La gentillesse est la noblesse de l'intelligence. »*





# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	29
<b>PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>31</b>
<b>I. La vaccination : généralités .....</b>	<b>33</b>
A. Les différents types de vaccins.....	33
1. Les vaccins vivants.....	34
<i>a. Les vaccins atténués .....</i>	<i>34</i>
<i>b. Les vaccins vectorisés .....</i>	<i>35</i>
<i>c. Le vaccin génétique .....</i>	<i>36</i>
2. Vaccins inertes .....	39
<i>a. Les vaccins inactivés .....</i>	<i>39</i>
<i>b. Les vaccins sous-unitaires.....</i>	<i>39</i>
B. La réponse immune post-vaccinale : immunité générale et immunité muqueuse...	42
1. Les effecteurs de la réponse immune .....	42
2. La réponse immunitaire post-vaccinale.....	43
<b>II. Un Poxvirus en tant que vecteur vaccinal : les raisons d'un tel choix .....</b>	<b>45</b>
A. Classification des Poxvirus .....	46
B. Propriétés générales des Poxvirus .....	47
1. Morphologie .....	47
2. Le génome des Poxvirus .....	48
3. Le cycle infectieux des Poxvirus.....	49
4. Transmission du virus .....	51
C. Les avantages des Poxvirus en tant que vecteurs viraux vaccinaux.....	51
D. Les limites à l'utilisation des Poxvirus.....	53
E. Exemples de vaccins recombinants utilisant des Poxvirus.....	53
1. Les <i>Orthopoxvirus</i> : le VACV, premier vecteur vaccinal.....	53
2. Les <i>Avipoxvirus</i> en tant que vecteurs vaccinaux.....	55
3. Le MYXV en tant que vecteur vaccinal.....	57
<b>III. Vacciner contre la FCO : pourquoi et comment ? .....</b>	<b>60</b>
A. La maladie, sa distribution, sa propagation dans l'hémisphère nord .....	60
1. La FCO : généralités .....	60

2. Pathogénie .....	61
3. Epidémiologie .....	62
<i>a. Epidémiologie descriptive</i> .....	62
<i>b. Epidémiologie analytique : vecteur et transmission de la maladie</i> .....	62
<i>c. Cycle épidémiologique du BTV</i> .....	63
4. L'arrivée de la FCO en France .....	64
5. Prophylaxie.....	67
<i>a. Prophylaxie sanitaire</i> .....	67
<i>b. Prophylaxie médicale</i> .....	68
<b>B. Le BTV .....</b>	<b>69</b>
1. Cycle de multiplication virale du BTV .....	70
2. Les protéines du BTV .....	71
<i>a. Les cinq protéines du core</i> .....	71
<i>b. Les deux protéines de la capside externe</i> .....	72
<i>c. Les protéines non structurales</i> .....	74
<b>C. La réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par le BTV .....</b>	<b>74</b>
1. La protection conférée par les anticorps .....	74
2. L'immunité à médiation cellulaire .....	76
3. La réponse immunitaire hétérotypique.....	77
<b>D. La vaccination contre la FCO.....</b>	<b>78</b>
1. Les vaccins vivants atténués .....	79
2. Les vaccins inactivés.....	81
3. Les vaccins recombinants.....	82
<b>PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>87</b>
<b>I. Matériel et méthode .....</b>	<b>89</b>
A. Construction du MYXV recombiné exprimant VP7 (BTV 2) .....	89
1. Construction et structure des plasmides de transfert.....	89
2. Obtention et structure des virus recombinés .....	90
3. Contrôle de l'expression du transgène .....	90
B. Immunisation des moutons : le protocole vaccinal .....	91
C. Analyse de la réponse cellulaire .....	92
1. Test de prolifération lymphocytaire .....	92
2. Détection des LT CD8.....	94

D. Détection de la réponse humorale .....	95
1. Test ELISA indirect .....	95
2. Séroneutralisation.....	96
E. Epreuve virulente.....	97
1. Suivi clinique.....	97
2. Détection des anticorps anti-VP7 par ELISA de compétition.....	99
3. Mesure de la virémie par RT-PCR quantitative .....	100
<b>II. Résultats .....</b>	<b>101</b>
A. Réponse cellulaire .....	101
1. Test de lymphoprolifération .....	101
2. Réponse lymphocytaire T CD8 .....	105
B. Réponse humorale .....	105
1. ELISA.....	105
<i>a. Cinétique de la réponse humorale contre le vecteur vaccinal et le transgène pour les moutons vaccinés avec SG33-VP7 non adjuvé .....</i>	<i>105</i>
<i>b. Effet des cytokines adjuvantes.....</i>	<i>109</i>
2. Séroneutralisation.....	112
<i>a. Séroneutralisation du vecteur vaccinal SG33.....</i>	<i>112</i>
<i>b. Séroneutralisation du BTV 2 (homologue).....</i>	<i>112</i>
C. Epreuve virulente.....	113
1. Protection clinique.....	113
<i>a. Température rectale .....</i>	<i>113</i>
<i>b. Score clinique global.....</i>	<i>114</i>
2. Détection des anticorps anti-VP7 par ELISA de compétition.....	115
D. Bilan .....	118
<b>III. Discussion .....</b>	<b>120</b>
A. Pouvoir immunogène du Poxvirus SG33 chez les ovins.....	121
B. Choix de l'antigène recombinant pour la vaccination contre la FCO .....	125
C. VP2 une perspective pour l'avenir ?.....	127
D. A la recherche de l'induction d'une réponse immunitaire hétérotypique .....	128
E. L'implication de la réponse cellulaire, une piste à suivre ?.....	129
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>133</b>

<b>ANNEXES.....</b>	<b>143</b>
Annexe 1 : L'utilisation de cytokines adjuvantes.....	143
Annexe 2 : Protocole expérimental du test de prolifération lymphocytaire.....	145
Annexe 3 : Protocole expérimental de détection des LT CD8 spécifiques .....	147
Annexe 4 : Protocole expérimental du test ELISA indirect .....	149
Annexe 5 : Protocole expérimental du test de séroneutralisation.....	150
Annexe 6 : Protocole expérimental du test ELISA par compétition de liaison.....	151
Annexe 7 : Protocole expérimental de la PCR quantitative (kit Taqvet all genotypes, LSI <sup>ND</sup> , Lissieu, France) .....	152

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Classification des vaccins conventionnels et recombinants : Vaccins vivants .....	37
<b>Figure 2 :</b>	Classification des vaccins conventionnels et recombinants : Vaccins intermédiaires .....	38
<b>Figure 3 :</b>	Classification des vaccins conventionnels et recombinants : Vaccins inertes .....	41
<b>Figure 4 :</b>	Représentation schématique des Poxvirus (sauf <i>Parapoxvirus</i> ) .....	47
<b>Figure 5 :</b>	Morphologie d'un <i>Orthopoxvirus</i> .....	48
<b>Figure 6 :</b>	Cycle de réplication des Poxvirus .....	50
<b>Figure 7 :</b>	Cycle épidémiologique de la FCO .....	64
<b>Figure 8 :</b>	Cycle de réplication d'un <i>Orbivirus</i> .....	70
<b>Figure 9 :</b>	Organisation des protéines du BTV .....	73
<b>Figure 10 :</b>	Construction du virus recombiné SG33-VP7 .....	90
<b>Figure 11 :</b>	Protocole expérimental .....	92
<b>Figure 12 :</b>	Principe d'évaluation de la capacité du vecteur SG33-VP7 à activer les LT CD4 .....	94
<b>Figure 13 :</b>	Principe de l'ELISA indirect .....	96
<b>Figure 14 :</b>	Principe de l'ELISA par compétition de liaison .....	99
<b>Figure 15 :</b>	Résultat de la réponse cellulaire obtenue pour un des moutons immunisés avec SG33-VP7 .....	102

## TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Classification de la sous-famille des <i>Chlordopoxvirinae</i> .....	46
<b>Tableau 2 :</b>	Tableau descriptif du "scoring" clinique .....	98
<b>Tableau 3 :</b>	Tableau récapitulatif de l'essai vaccinal avec le vecteur SG33-VP7 ....	119

## CARTES

<b>Carte 1 :</b>	Propagation de la FCO en Europe : situation au 7 mai 2008 .....	66
<b>Carte 2 :</b>	Situation en France continentale au 19 septembre 2008 .....	67

## GRAPHIQUES

<b>Graphique 1 :</b>	Activation des LT CD4 (J90) des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 .....	103
<b>Graphique 2 :</b>	Activation des LT CD4 (J90) de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience : effet des cytokines adjuvantes .....	104
<b>Graphique 3 :</b>	Réponse anticorps anti-SG33-VP7 des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 .....	107
<b>Graphique 4 :</b>	Réponse anticorps anti-VP7 des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 .....	108
<b>Graphique 5 :</b>	Réponse anticorps anti-SG33-VP7 de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience .....	110
<b>Graphique 6 :</b>	Réponse anticorps anti-VP7 de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience .....	111
<b>Graphique 7 :</b>	Suivi de la température des moutons soumis à l'épreuve virulente (BTV 2) .....	114
<b>Graphique 8 :</b>	Evolution du score clinique au cours de l'épreuve virulente .....	115
<b>Graphique 9 :</b>	ELISA par compétition de liaison sur les sérums des animaux soumis à l'épreuve virulente .....	116
<b>Graphique 10 :</b>	Mesure de la virémie des moutons soumis à l'épreuve virulente par PCR quantitative .....	117

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ACK</b>	Acétate de potassium
<b>ADCC</b>	Antibody dependant cellular cytolysis ou Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>Ag</b>	Antigène
<b>AHS</b>	African horse sickness ou Peste équine
<b>AHSV</b>	<i>African horse sickness virus</i> ou Virus de la peste équine
<b>ALVAC</b>	Souche atténuée du <i>Canarypox virus</i>
<b>APC</b>	Allophycocyanine
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>BoHV-1</b>	<i>Bovine herpesvirus 1</i> ou Virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine
<b>BSA</b>	Bovine serum albumine ou Albumine sérique bovine
<b>BTV</b>	<i>Bluetongue virus</i> ou Virus de la bluetongue
<b>CD</b>	Cluster of differentiation ou Groupe de différenciation
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescéine succinimidyl ester
<b>CLP</b>	Core-like particle ou Protéine du core
<b>CMH I</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
<b>CMH II</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<b>CNPV</b>	<i>Canarypox virus</i> ou Poxvirus du canari
<b>ConA</b>	Concanavaleine A
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CPXV</b>	<i>Cowpox virus</i> ou Virus de la variole bovine
<b>CSF</b>	Colony stimulating factor ou Facteur de croissance
<b>Ct</b>	Cycle threshold ou Cycle-seuil
<b>Da</b>	Daltons
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium ou Milieu minimum essentiel de Eagle modifié Dubelco/vogt

<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DO<sub>CN</sub></b>	Moyenne des densités optiques des contrôles négatifs
<b>DO<sub>CP</sub></b>	Moyenne des densités optiques des contrôles positifs
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus ou Virus de la maladie d'Epstein-Barr
<b>ECP</b>	Effet cytopathique
<b>Eco gpt</b>	Escherichia coli xanthine-guanine phosphoribosyltransférase
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid ou Acide éthylène diamine tétra acétique
<b>EEV</b>	Envelopped extracellular virus ou Forme extracellulaire enveloppée
<b>EHDV</b>	<i>Epizootic hemorrhagic disease virus</i> ou Virus de la maladie hémorragique des cervidés
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ENVT</b>	Ecole nationale vétérinaire de Toulouse
<b>FA</b>	Fièvre aphteuse
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting ou Tri cellulaire à partir de la fluorescence
<b>FBS</b>	Fœtal bovine serum ou Sérum bovin foetal
<b>FCO</b>	Fièvre catarrhale ovine
<b>FCV</b>	<i>Feline calicivirus</i> ou Calicivirus félin
<b>FeLV</b>	<i>Feline leukemia virus</i> ou Virus de la leucose féline
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate ou Isothiocyanate de fluorescéine
<b>FLUAV</b>	<i>Influenza A virus</i> ou Virus Influenza A
<b>FLUBV</b>	<i>Influenza B virus</i> ou Virus Influenza B
<b>FMDV</b>	<i>Fouth-and-mouth disease virus</i> ou Virus de la fièvre aphteuse
<b>FWPV</b>	<i>Fowlpox virus</i> ou Poxvirus du poulet
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage - colony stimulating factor ou Facteur de croissance pour granulocyte et macrophage
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt solution ou Solution saline équilibrée de Hank
<b>HHV-4</b>	<i>Human herpes virus 4</i> ou Virus de la maladie d'Epstein-Barr
<b>HIV</b>	<i>Human immunodeficiency virus</i> ou Virus de l'immunodéficience humaine
<b>IBRV</b>	Infectious bovine rhinotracheitis virus ou Virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine



<b>ID</b>	Intradermique
<b>IFN</b>	Interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IHAP</b>	Interaction hôte/agent pathogène
<b>IMV</b>	Intracellular Mature Virus ou Forme intracellulaire mature
<b>INRA</b>	Institut national de la recherche agronomique
<b>IP</b>	Iodure de propidium
<b>J</b>	Jour
<b>kb</b>	1000 paires de bases
<b>LAK</b>	Lymphokine-activated killer
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LTc</b>	Lymphocyte T cytotoxique
<b>LTh</b>	Lymphocyte T helper ou LymphocyteT auxiliaire
<b>MGF</b>	Myxoma growth factor ou Facteur de croissance du virus myxomateux
<b>MHR</b>	Myxoma host range ou Protéines définissant le spectre d'hôte du virus myxomateux
<b>ml</b>	Millilitre
<b>mM</b>	Millimolaire
<b>MOI</b>	Multiplicity of infection ou Rapport virus/cellule
<b>MPA</b>	Mycophenolic acid ou Acide mycophénolique
<b>MYXV</b>	<i>Myxoma virus</i> ou Virus de la myxomatose
<b>NK</b>	Natural killer
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>OIE</b>	Office international des épizooties
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cell ou Cellule mononucléée
<b>PBS</b>	Phosphate buffererd saline ou Tampon phosphate salin
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction ou Amplification par la polymérase
<b>pDC</b>	Plasmacytoid dendritic cells ou Cellules dendritiques plasmacytoïdes
<b>PE</b>	Phycoérythrine
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde

<b>PFIE</b>	Plate forme d'infectiologie expérimentale
<b>PGPV</b>	<i>Pigeonpox virus</i> ou Poxvirus du pigeon
<b>POD</b>	Péroxydase
<b>PrV</b>	Pseudorabies virus ou Virus de la pseudorage
<b>P/S</b>	Pénicilline / streptomycine
<b>RABV</b>	<i>Rabies virus</i> ou Virus de la rage
<b>RHDV</b>	<i>Rabbit viral hemorrhagic disease virus</i> ou Virus de la maladie hémorragique virale du lapin
<b>RK13</b>	Rabbit kidney 13 ou Cellule rénale de lapin 13
<b>RPMIc</b>	Roswell Park Memorial Institute medium complet ou Milieu complet du Roswell Park Memorial Institute
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction ou Transcription inverse et amplification par la polymérase
<b>SG33</b>	Saurat et Gilbert 33
<b>SuHV-1</b>	<i>Suid herpesvirus 1</i> ou Virus de la maladie d'Aujeszky
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>TA</b>	Température ambiante
<b>TK</b>	Thymidine kinase
<b>TMB</b>	Tétraméthylbenzidine
<b>TOV</b>	<i>Toggenburg virus</i>
<b>Tris</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>UMR</b>	Unité mixte de recherche
<b>ufp</b>	Unité formant plaque
<b>VACV</b>	<i>Vaccinia virus</i> ou Virus de la vaccine
<b>VSIV</b>	<i>Vesicular stomatitis Indiana virus</i> ou Virus de la stomatite vésiculeuse de sérotype Indiana
<b>VIB</b>	Viral inclusion bodies ou Corps d'inclusion viraux
<b>VLP</b>	Virus-like particle ou Protéine de la capsid externe
<b>VP7</b>	Viral protein 7 ou Protéine virale 7
<b>WNV</b>	<i>West Nile virus</i> ou Virus du Nil occidental
°C	Degré Celsius
<sup>14</sup> C	Carbone 14

<b>μg</b>	Microgramme
<b>μl</b>	Microlitre
<b>μm</b>	Micromètre
<b>μM</b>	Micromolaire
<b>% compétition</b>	Pourcentage de compétition



# INTRODUCTION

La récente apparition de la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou bluetongue en Europe du Nord, notamment en France, a conduit à des campagnes de vaccination importantes sur le territoire depuis 2007. Si ces mesures ont permis une diminution très significative du nombre de foyers, la FCO sévit toujours, et à la veille d'une nouvelle campagne de vaccination, l'efficacité et l'innocuité des vaccins à virus inactivés utilisés sont discutées. De plus, la pluralité des sérotypes incite les autorités sanitaires à explorer d'autres stratégies vaccinales. Une approche possible consisterait à utiliser un vaccin vectorisé exprimant des antigènes du *Bluetongue virus* [BTV] (virus de la bluetongue ou virus de la FCO) suffisamment conservés pour induire une protection croisée entre plusieurs sérotypes.

Dans ce cadre, les Poxvirus représentent des outils attractifs en tant que vecteurs vaccinaux grâce à leur grande stabilité, la possibilité d'intégrer dans leur génome de larges séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) étranger et leur capacité à induire une réponse immunitaire à médiation humorale et surtout cellulaire. Parmi les Poxvirus, le *Myxoma virus* [MYXV] (virus de la myxomatose ou virus myxomateux) a montré de grandes qualités pour la production de vaccins vectorisés sûrs et immunogènes chez les ruminants.

C'est ainsi qu'il a été créé au laboratoire un virus recombiné utilisant la souche vaccinale Saurat et Gilbert 33 (SG33) du MYXV comme vecteur, dans le génome duquel a été inséré un gène codant pour la protéine virale 7 (viral protein 7 ou VP7) du BTV qui présente l'atout majeur d'être l'antigène de groupe, très conservé entre les sérotypes.

Cette étude rend compte des premiers essais cliniques réalisés *in vitro* et *in vivo* avec ce vecteur vaccinal permettant non seulement de vérifier la capacité répliquative et l'innocuité du MYXV lors d'inoculation intradermique (ID) chez le mouton, mais surtout de tester le potentiel immunogène et protecteur de la protéine VP7 en tant que transgène. S'il était efficace, on pourrait espérer ainsi étendre le spectre de protection à l'ensemble des 24 sérotypes du BTV.



**PARTIE I :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**





# **I. La vaccination : généralités**

Le principe de la vaccination consiste à administrer à un être vivant tout ou partie d'un agent pathogène capable de provoquer chez celui-ci une immunité spécifique vis-à-vis de cet agent, ainsi qu'une mémoire immunitaire susceptible de produire une réponse plus rapide et plus intense que celle observée lors de la primo-infection.

## **A. Les différents types de vaccins (Eloit, 1998 - 1)**

Les vaccins sont divisés en deux types : les vaccins vivants utilisant une souche capable de se multiplier au moins *in vitro* et les vaccins inertes incapables de se répliquer. Les vaccins recombinants, qui sont l'objet de notre étude, peuvent appartenir à chacune de ces deux catégories. Ils sont obtenus par des techniques de clonage moléculaire du génome des microorganismes, de manière à obtenir un principe actif ayant une efficacité vaccinale.

Deux voies principales sont actuellement utilisées, en complément plutôt qu'en remplacement des approches traditionnelles : la première consiste en une délétion de certains gènes impliqués dans la virulence des microorganismes de manière à isoler des souches vivantes atténuées de façon raisonnée. Cette voie est encore peu utilisée. La seconde, plus fréquente, ne retient qu'une fraction (ou quelques rares fractions) immunogène(s) de l'agent pathogène, préalablement identifiée(s) comme majeure(s) parmi les cibles antigéniques de la réponse immunitaire.

A partir de cette approche, différents types de vaccins recombinants se déclinent en fonction du mode de présentation de ces immunogènes au système immunitaire :

- **Vaccins vivants** quand le gène codant une protéine immunogène est introduit dans un autre microorganisme capable de se répliquer qui joue le rôle de vecteur.
- **Vaccins de nature intermédiaire** quand le gène codant une protéine immunogène est délivré à l'animal, soit par l'intermédiaire d'un vecteur viral incapable de se multiplier, soit sous forme d'ADN nu. Ces vaccins sont inertes au sens où ils ne se multiplient pas chez l'hôte mais permettent une présentation de l'antigène au système immunitaire d'une manière comparable à celle produite par les vaccins vivants.

- **Vaccins inertes** lorsque les antigènes sont purifiés, produits *in vitro* par des techniques de génie génétique, ou que des sous fractions d'entre eux sont produites par synthèse chimique.

## 1. Les vaccins vivants

Les vaccins vivants peuvent être classés en **vaccins atténués**, c'est-à-dire incluant une souche de l'agent pathogène ou d'un agent infectieux proche possédant un pouvoir pathogène faible ou nul pour l'espèce de destination, et en **vaccins vectorisés**, c'est-à-dire incluant un agent infectieux non pathogène (vecteur) dont le génome a été modifié afin d'inclure un ou plusieurs gènes codant pour des protéines immunogènes de l'agent pathogène cible.

### *a. Les vaccins atténués*

Les souches atténuées utilisées pour fabriquer des vaccins vivants peuvent provenir de plusieurs origines.

- Souches spontanément avirulentes (Figure 1, A)

Certaines souches isolées du terrain sont spontanément avirulentes, en particulier vis-à-vis d'une autre espèce cible. Historiquement, c'est l'exemple de la variole. Ainsi, dès 1798, Jenner a pu vacciner l'homme contre cette maladie en utilisant le *Cowpox virus* [CPXV] (virus de la variole bovine) puis le *Vaccinia virus* [VACV] (virus de la vaccine).

- Souches atténuées par des moyens conventionnels (Figure 1, A)

Le principe de sélection de souches virales atténuées est d'isoler parmi une population virale initiale un clone de moindre virulence. La sélection de variants non pathogènes est réalisée par différentes techniques : passages répétés en culture cellulaire, passages sur une espèce animale différente de l'espèce cible ; ces procédures provoquent une atténuation sans que l'on ait la maîtrise des mécanismes mobilisés. Il est néanmoins parfois possible d'obtenir des mutants selon un mécanisme préalablement choisi (Figure 1, B) : ainsi la multiplication de souches virales en présence d'un anticorps monoclonal contre une protéine peut permettre d'obtenir un mutant de délétion spécifique ; la croissance en milieu sélectif conduit à

l'obtention de mutants défectifs pour le gène de la thymidine kinase (TK) et dont la virulence est atténuée (Herpesvirus, Poxvirus). Dans ce cas, la stabilité de l'atténuation et les risques de recombinaison avec les souches sauvages ne sont pas prévisibles.

- Souches atténuées par délétion de gènes (Figure 1, C)

Il s'agit là d'un premier type de vaccin recombinant. La délétion de ces gènes associés à la virulence permet de réaliser de manière raisonnée, l'atténuation de la souche vaccinale. Par ailleurs la vaccination à l'aide de souches atténuées par délétion de gènes permet de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés. La mise en évidence d'anticorps contre la protéine absente de la souche vaccinale indique en effet qu'il y a eu infection naturelle. Par exemple, au moins quatre gènes sont impliqués dans la neurovirulence du *Suid herpesvirus 1* [SuHV-1] ou Pseudorabies virus [PrV] (virus de la maladie d'Aujeszky ou virus de la pseudorage). La délétion ou la modification de certains d'entre eux permet d'abolir la virulence de ces souches pour le porc. Le *Bovine herpesvirus 1* [BoHV-1] ou Infectious bovine rhinotracheitis virus [IBRV] (virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine), a bénéficié du même type d'approche pour isoler des souches atténuées. La mise en évidence d'anticorps contre la glycoprotéine E absente de la souche vaccinale des deux Herpesvirus, le PrV (Van Oirschot *et al.*, 1990 - 2) ou l'IBRV, indique alors qu'il y a eu infection naturelle dans les hôtes naturels de ces virus.

#### *b. Les vaccins vectorisés*

Les techniques de la biologie moléculaire n'ont pas seulement permis d'identifier certains gènes de virulence, elles ont aussi conduit à l'identification des protéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée. Le gène de cette ou de ces protéines, voire une séquence génique codant pour une petite fraction de cette protéine, peuvent alors être transférés dans un autre microorganisme (virus ou bactérie), appelé **vecteur**, possédant des caractéristiques adéquates de sécurité et d'efficacité pour la voie d'administration retenue. Ce microorganisme va, après administration à l'hôte, induire une réponse immune contre la protéine étrangère. Cette approche correspond à un deuxième type de vaccin recombinant.

- Vecteurs réplicatifs (Figure 1, D)

L'approche initiale de cette stratégie a été de produire des vecteurs capables de se multiplier chez l'hôte en dépit de la présence d'un gène étranger intégré à leur génome. Ainsi le VACV (ou ses dérivés), celui-là même qui avait permis la vaccination de l'homme contre la variole, a été utilisé avec succès. La réussite probablement la plus démonstrative de cette approche a été la construction d'un VACV porteur du gène de la glycoprotéine G du *Rabies virus* [RABV] (virus de la rage ou virus rabique), capable de vacciner le renard contre la rage par voie orale.

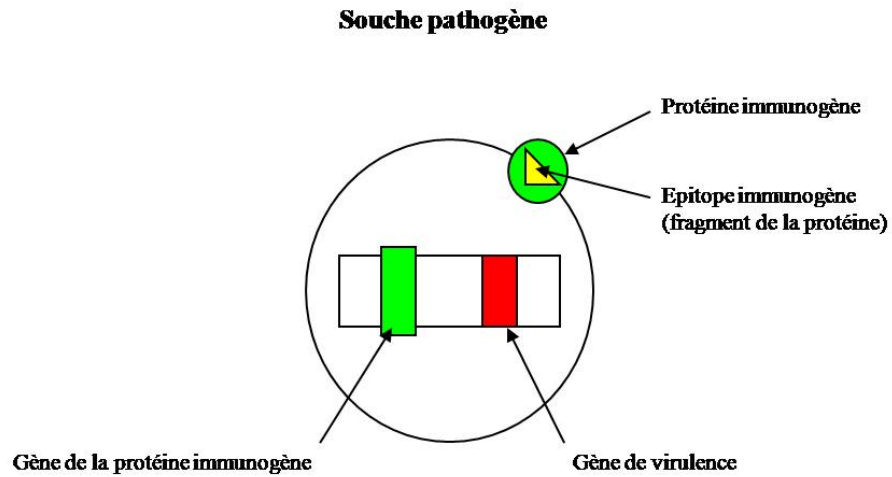
- Vecteurs non réplicatifs (Figure 2, E)

La construction de virus réplicatifs, pour séduisante qu'elle soit en terme d'efficacité, peut poser des problèmes de biosécurité. En effet, il n'est pas souhaitable que des virus recombinants puissent diffuser d'animal à animal. Il a donc été imaginé d'utiliser des virus qui sont incapables de se multiplier chez l'animal naturellement ou par délétion de gènes essentiels. Ainsi le *Canarypox virus* [CNPV] (Poxvirus du canari) est un virus aviaire incapable de se multiplier chez les mammifères. Il en est de même avec le genre *Leporipoxvirus* dont le spectre d'hôte est limité aux lagomorphes et plus précisément le MYXV qui touche exclusivement le lapin européen et ne se réplique pas *in vivo* chez les autres espèces. Les virus agissent alors comme de simples seringues moléculaires.

Cette approche est satisfaisante au plan de la biosécurité. Une de ses limites est qu'elle nécessite initialement des quantités élevées de virus pour être efficace. Néanmoins, de grands progrès ont été réalisés et les doses efficaces peuvent être désormais inférieures à celles de vaccins inactivés conventionnels.

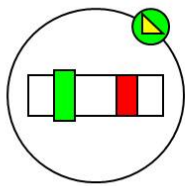
*c. Le vaccin génétique* (Figure 2, I)

Cette stratégie est tout à fait comparable aux essais actuels de thérapie génique, dans lesquels un gène est introduit *in vivo* dans des cellules cibles par l'intermédiaire de vecteurs viraux. Ce sont d'ailleurs les mêmes vecteurs qui sont utilisés.



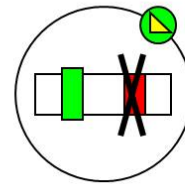
**Vaccins vivants**

**A. Vaccin atténué conventionnel**



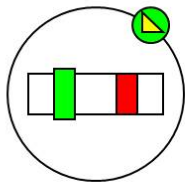
Vaccin atténué obtenu de manière « aveugle »

**C. Vaccin atténué par mutagenèse dirigée**



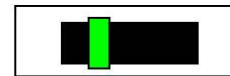
Délétion sélective du gène de virulence par des techniques de recombinaison génétique

**B. Vaccin atténué par sélection contre le produit d'un gène**



Sélection de mutants n'exprimant pas un gène de virulence

**D. Vaccin vectorisé répliquatif**



Insertion du gène d'une protéine immunogène dans un microorganisme capable de se multiplier

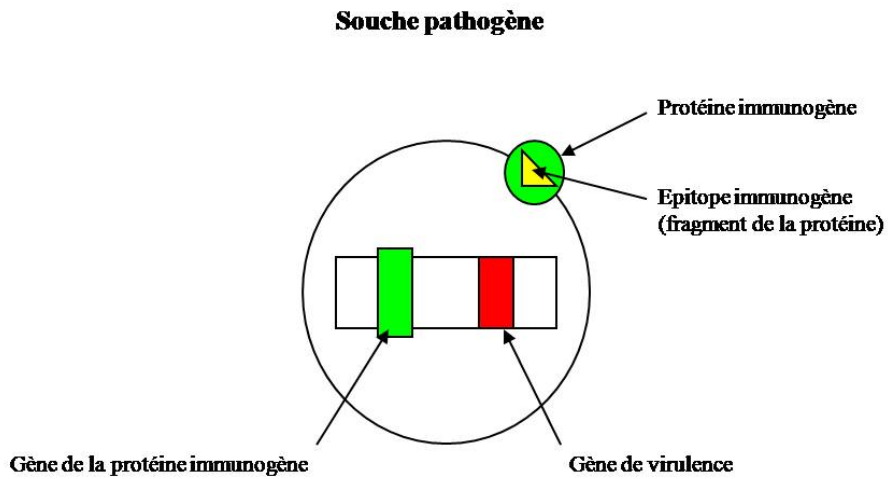
**Figure 1 : Classification des vaccins conventionnels et recombinants**

**Vaccins vivants**

(D'après Eloit, 1998 – 1)

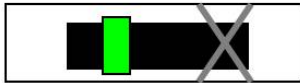
Légende :

Les différents types de vaccins recombinants sont surlignés en jaune : C, D.



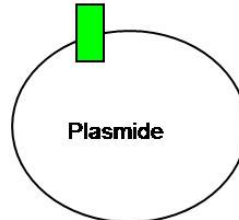
**Vaccins intermédiaires**

**E. Vaccin vectorisé non réplcatif**



**Insertion du gène d'une protéine immunogène dans un microorganisme incapable de se multiplier**

**I. Vaccin génétique**



**Le gène de la protéine immunogène est directement administré à l'animal**

**Figure 2 : Classification des vaccins conventionnels et recombinants**

**Vaccins intermédiaires**

(D'après Eloit, 1998 – 1)

Légende :

Les différents types de vaccins recombinants sont surlignés en jaune : E, I.

## 2. Vaccins inertes

### *a. Les vaccins inactivés (Figure 3, F)*

Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique (chaleur) ou plus souvent, chimique (formol,  $\beta$ propiolactone, éthylènimine ...) qui entraîne une perte totale de la capacité infectante sans dénaturer le pouvoir immunogène. Ces vaccins doivent contenir une grande masse d'agent pathogène et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvant. Ils sont habituellement très sûrs dans la mesure où les procédures d'inactivation utilisées par les firmes productrices sont désormais précisément définies.

### *b. Les vaccins sous-unitaires*

Les connaissances actuelles sur les agents pathogènes ont permis dans certains cas, l'identification des principales protéines cibles de la réponse immune. Ces informations peuvent permettre de développer des vaccins inertes sous-unitaires, uniquement constitués de ces antigènes, qu'ils soient purifiés à partir de l'agent pathogène, ou bien produits *in vitro* par des techniques de génie génétique.

#### - Antigènes purifiés (Figure 3, G)

Certains vaccins contiennent pour seul composant immunogène une ou des protéines de l'enveloppe virale. Cette approche permet de diminuer la part de protéines non nécessaires dans un vaccin et ainsi de limiter les réactions non désirables.

#### - Protéines produites par génie génétique (Figure 3, G)

Il est parfois impossible, ou simplement difficile et coûteux, d'obtenir certaines protéines de microorganismes par purification. Dans le cas de protéines, une alternative peut être d'exprimer le gène correspondant dans des systèmes *in vitro*, correspondant à un troisième type de vaccin recombinant.

- Peptides de synthèse (Figure 3, H)

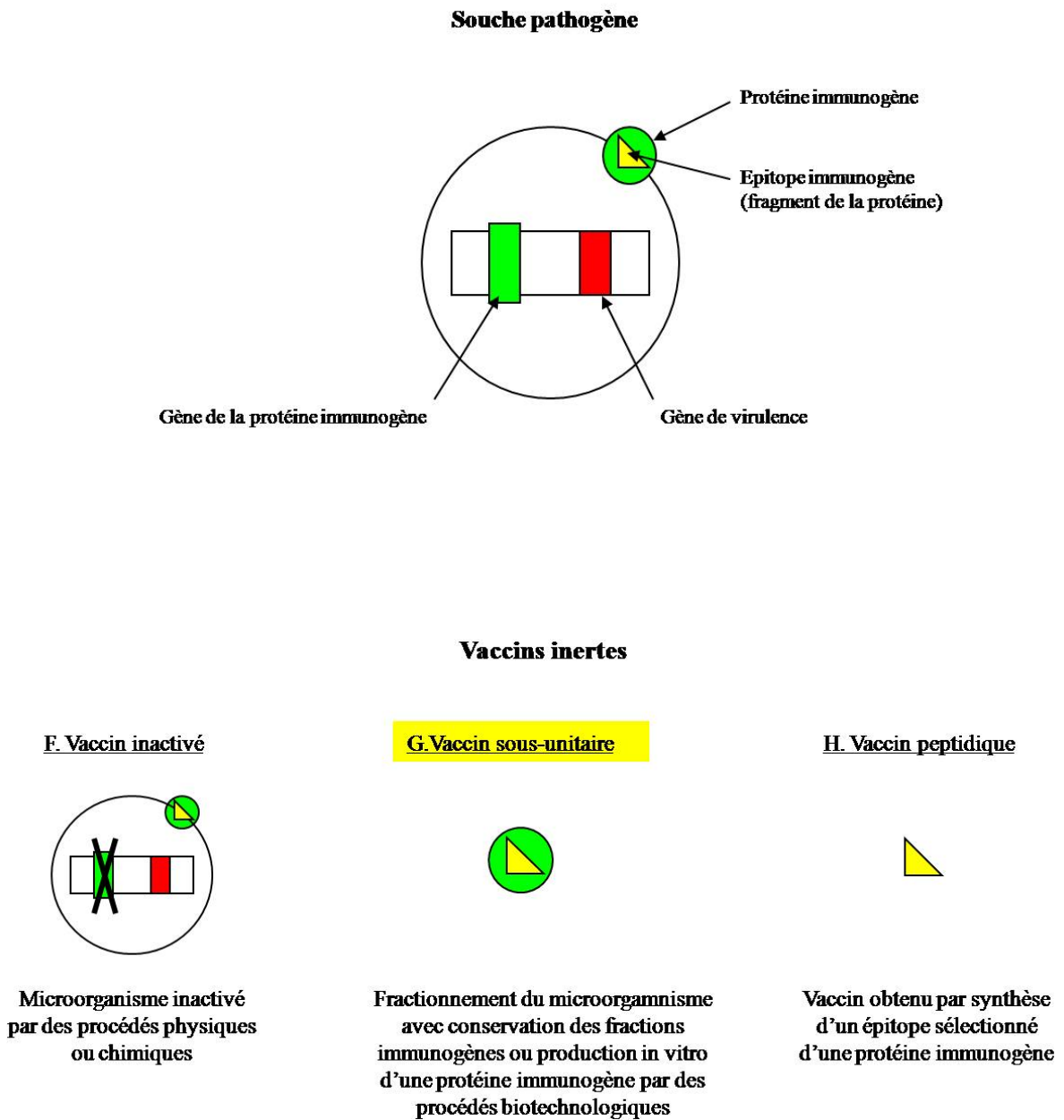
La réponse immune de l'hôte est surtout dirigée contre certaines protéines de l'agent pathogène. Cette réponse n'est pas dirigée contre toute la protéine mais surtout contre certains de ses fragments appelés épitopes, correspondant à quelques acides aminés (il s'agit d'un peptide). Certains épitopes sont dits conformationnels, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas reconnus s'ils adoptent une conformation spatiale différente de celle qu'ils ont dans la protéine native. D'autres, au contraire, sont dits linéaires parce qu'ils sont reconnus par le système immunitaire même si leur structure dans l'espace est modifiée. Cette dernière catégorie d'épitopes est synthétisable, par synthèse chimique de l'enchaînement des acides aminés qui les composent. De manière à obtenir une immunogénicité correcte, ces peptides doivent le plus souvent être couplés après synthèse à une protéine porteuse (comme l'ovalbumine) et être adjuvés. Néanmoins aucun vaccin utilisant cette approche n'est pour l'instant commercialisé. Les vaccins constitués de protéines ou de peptides produits par génie génétique présentent une très grande innocuité.

- L'immunisation génétique

L'injection intramusculaire du fragment d'ADN codant pour la protéine vis-à-vis de laquelle on veut immuniser l'organisme (c'est-à-dire de l'ADN nu) permet de susciter le développement d'une réponse immune (Ulmer *et al.*, 1993 - 3). Ce type de vaccin correspond à un quatrième type de vaccin recombinant. De nombreux laboratoires utilisent actuellement cette approche, sans qu'un vaccin commercialisé ni que des éléments convergents de comparaison avec des vaccins obtenus par d'autres stratégies soient actuellement disponibles.

➤ Ainsi, les vaccins recombinants sont obtenus par des techniques de clonage moléculaire du génome des microorganismes, de manière à obtenir un principe actif ayant une efficacité vaccinale ; ils peuvent donc appartenir à plusieurs des catégories décrites précédemment.





**Figure 3 : Classification des vaccins conventionnels et recombinants**

**Vaccins inertes**  
(D'après Eloit, 1998 – 1)

Légende :

Les différents types de vaccins recombinants sont surlignés en jaune : G.

## **B. La réponse immune post-vaccinale : immunité générale et immunité muqueuse** (Eloit, 1998 - 1)

### 1. Les effecteurs de la réponse immune

La réponse immunitaire vis-à-vis des virus repose essentiellement sur deux types d'effecteurs : les **anticorps** et les **lymphocytes T cytotoxiques (LTc)**, qui permettent à l'organisme de lutter contre une infection en agissant soit sur le virus extracellulaire, soit sur les cellules infectées.

Le virus extracellulaire peut être neutralisé par des anticorps reconnaissant certains épitopes particuliers, généralement situés à la surface du virus : les **anticorps neutralisants**. Ceux-ci peuvent agir de différentes manières : attachement à des protéines nécessaires à la fixation ou à la pénétration dans les cellules, déformation de la capsid. Le virus extracellulaire peut également être recouvert par des anticorps, il est alors plus efficacement phagocyté par certaines cellules. S'il s'agit d'un virus enveloppé, l'attachement des anticorps peut également provoquer l'activation du complément et la lyse de l'enveloppe.

Les cellules infectées qui possèdent à leur surface des fragments de protéines virales en association avec les molécules d'histocompatibilité de classe I ou complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), peuvent être détruites par les LTc lorsqu'ils reconnaissent ces complexes. Si elles expriment un antigène viral à leur surface (ce qui est fréquent), elles peuvent également être reconnues par des anticorps et en définitive détruites par des cellules tueuses. Ce mécanisme est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (antibody dependant cellular cytolysis ou ADCC). Enfin, elles peuvent être détruites par des cellules natural killer (NK), phénomène sans spécificité immunologique.

## 2. La réponse immunitaire post-vaccinale

La réponse post-vaccinale varie en fonction du mode de présentation de l'antigène au système immunitaire.

- Réponse immunitaire associée aux vaccins vivants composés de souches atténuées

Ils présentent tous les antigènes de l'agent pathogène, qu'ils soient majeurs ou mineurs, et sont susceptibles de se multiplier chez l'hôte ; ainsi ils sont les plus capables d'induire une réponse immune proche de celle de l'infection naturelle. Ils peuvent en particulier induire à la fois une réponse cellulaire cytotoxique et une réponse anticorps. Cependant, l'atténuation d'une souche peut conduire à un très faible degré de réplication chez l'hôte, ce qui est néfaste pour l'induction d'une réponse cellulaire. En outre, il est rare que les vaccins vivants soient administrés par la même voie que celle qui produit l'infection, et qui est généralement associée à une muqueuse. L'induction d'une forte immunité muqueuse est alors compromise. Idéalement, le vaccin le plus efficace devrait être une souche atténuée administrée par la voie naturelle d'infection.

- Réponse immunitaire induite par les vaccins inertes

A l'état brut (sans adjuvant), ils sont capables d'induire une réponse humorale qui est généralement de très faible intensité. De manière générale, ils n'induisent pas de réponse qui nécessite une synthèse de protéines intracellulaires, ainsi qu'une présentation au système immunitaire via le CMH I. Ils sont incapables d'induire une immunité muqueuse significative, lorsqu'ils sont administrés par cette voie. Enfin ils sont plus coûteux à produire et on admettra que, comparés aux vaccins vivants, les vaccins inertes semblent ne posséder que des désavantages qui sont seulement compensés par leur innocuité. Pourtant l'expérience montre que nombre de ces vaccins se révèlent aussi efficaces que des vaccins vivants, y compris contre des maladies virales pour lesquelles la composante cytotoxique de l'immunité est importante. Ceci s'explique par le rôle des anticorps dans la neutralisation du virus, alors que son cycle, à un moment ou à un autre, est extracellulaire. De plus, les cellules infectées par des virus peuvent être détruites par des mécanismes d'ADCC en l'absence de réponse cellulaire cytotoxique.

- Réponse immunitaire induite par les vaccins vivants vectorisés

Ils représentent *a priori* un bon compromis. Ils permettent également la présentation de l'antigène au système immunitaire de manière adéquate et suscitent **l'induction d'une immunité à la fois humorale et cytotoxique**. Les vecteurs non réplicatifs nécessitent habituellement des doses plus élevées, mais fournissent des garanties plus solides en termes de dissémination dans l'environnement, tout comme la vaccination génétique. Il s'agit cependant d'une approche assez réductionniste, limitant les antigènes utilisés à un petit nombre, ce qui peut être limitant pour des agents pathogènes complexes. L'induction d'une immunité muqueuse est essentiellement fonction de la voie d'administration.

➤ Les vaccins vectorisés sont donc intéressants pour leur innocuité mais également en raison de leur efficacité puisqu'ils stimulent l'immunité de manière adéquate pour protéger les animaux contre une infection. Ainsi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux vaccins recombinants vectorisés à vecteur non réplicatif, à travers l'élaboration d'un vaccin constitué du MYXV dans lequel nous avons inséré un gène codant pour une protéine du BTV.

➤ Ainsi, après avoir décrit les caractéristiques du MYXV retenu comme vecteur dans notre projet, nous présenterons la FCO, maladie virale contre laquelle nous souhaitons vacciner les animaux, ainsi que les particularités de la protéine que nous avons choisie comme immunogène.

## **II. Un Poxvirus en tant que vecteur vaccinal : les raisons d'un tel choix**

Les Poxvirus ont joué un rôle très important en virologie, immunologie et vaccinologie. En effet, la découverte du Dr Edward Jenner en 1776 a permis l'éradication de la variole humaine de la surface du globe. Ce dernier a délibérément inoculé à des individus le CPXV (appartenant au genre *Orthopoxvirus*, comme le VACV) dans le but de les protéger contre la variole humaine, avec lequel il partage des similitudes antigéniques. Cet essai ayant été un franc succès, la vaccination à l'échelle mondiale a été entreprise grâce à un vaccin élaboré à partir du CPXV rapidement remplacé par un vaccin contenant le VACV, très proche, mais qui entraîne une réaction vaccinale plus modérée.

L'intérêt pour le VACV s'est accru dans les années 80 grâce au génie génétique qui permet de cloner et d'exprimer des gènes étrangers avec un virus dit recombinant. Les travaux de ces 25 dernières années ont permis d'améliorer la sécurité des vecteurs dérivés des Poxvirus, avec le développement de souches atténuées du VACV et la découverte des *Avipoxvirus* qui se sont montrés des vecteurs extrêmement sûrs et non répliatifs quand ils sont employés dans des espèces non aviaires. Les virus recombinants ont de multiples applications et ont conduit au développement de vecteurs vaccinaux comme celui de la vaccine-rage employé pour éliminer la rage en Europe de l'Ouest, et plus récemment aux Etats-Unis (Pastoret *et al.*, 2003 - 4).

## A. Classification des Poxvirus

Les Poxvirus infectent les arthropodes, les oiseaux et les mammifères. Ils comptent parmi les plus gros virus. La famille des *Poxviridae* est divisée en deux sous familles : les *Clordopoxvirinae* et les *Entomopoxvirinae* dont les spectres d'hôtes sont respectivement les vertébrés et les insectes. Les *Clordopoxvirinae* sont représentés par huit genres (Tableau 1): les *Avipoxvirus*, les *Capripoxvirus*, les *Leporipoxvirus*, les *Molluscipoxvirus*, les *Orthopoxvirus*, les *Parapoxvirus*, les *Suipoxvirus* et les *Yatapoxvirus*. Les membres d'un même genre ont la même morphologie et sont génétiquement et antigéniquement proches. Le spectre d'hôte est étroit, lié à une espèce cible pour chacun des virus, à l'exception du VACV. Ces virus sont en outre responsables d'un certain nombre de maladies graves, dont la variole chez l'Homme, qui a maintenant disparu, mais aussi sept zoonoses en général bénignes. Les *Orthopoxvirus* et les *Parapoxvirus* sont les principaux responsables de ces zoonoses.

**Tableau 1 : Classification de la sous-famille des *Chlordopoxvirinae***

(D'après Moss B., Fields Virology, Third Ed., Vol. 2, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p 2640)

Genre	Espèce type
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i> (virus de la vaccine)
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i> (virus de l'ecthyma contagieux)
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i> (virus de la variole aviaire)
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i> (virus de la clavelée)
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i> (virus de la myxomatose)
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i> (virus de la variole porcine)
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i> (virus du molluscum contagiosum)
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i> (virus de la tumeur Yaba du singe)

## B. Propriétés générales des Poxvirus

### 1. Morphologie (Moss, 2001 - 5)

Nous allons décrire à titre d'exemple les virus du genre *Orthopoxvirus* qui est représentatif de la sous famille des *Chlordopoxvirinae*, exception faite du genre *Parapoxvirus* qui est particulier mais en dehors du sujet de cet exposé.

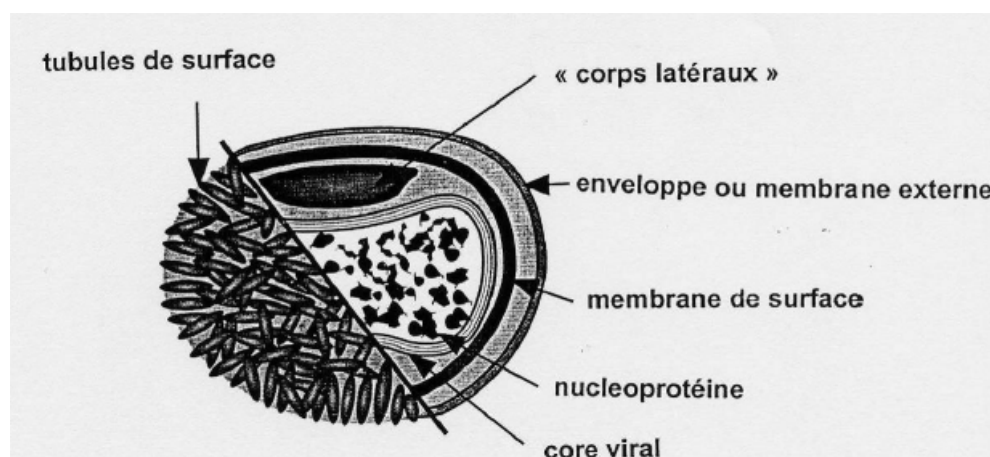
Il s'agit de gros virus, ronds ou ovales, à symétrie sphérique, qui présentent un treillis protéique régulier. On peut observer un corps en forme d'altère dans le virus qui forme un semblant de noyau car il contient le génome. On peut également observer des corps latéraux amorphes qui sont des masses protéiques dont on ne connaît ni l'origine ni le rôle. On note la présence de deux enveloppes : une membrane de surface et une enveloppe avec entre les deux des éléments tubulaires de surface dont le rôle n'est pas connu.

Ils se présentent sous deux formes :

- Forme extracellulaire enveloppée (enveloped extracellular virus ou EEV) à enveloppe double.
- Forme intracellulaire mature (intracellular mature virus ou IMV) à enveloppe simple.

Un certain nombre de protéines sont enchâssées dans la première enveloppe et d'autres dans la deuxième enveloppe.

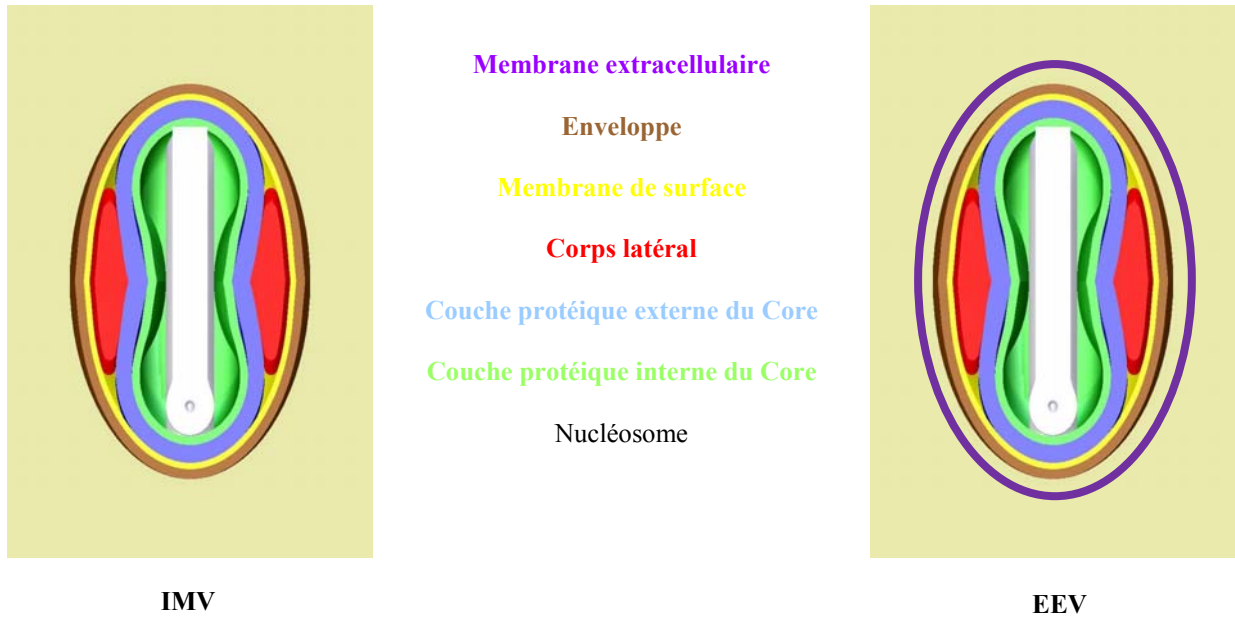
La morphologie des Poxvirus est reprises schématiquement figures 4 et 5.



**Figure 4: Représentation schématique des Poxvirus (sauf *Parapoxvirus*)**

(D'après VAN REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., *et al.*  
Virus taxonomy, Classification and nomenclature of viruses.

In: Seventh report of the international comitee on taxonomy of viruses, 2000, San Diego, California: Academic Press.)



**Figure 5: Morphology d'un *Orthopoxvirus***

<http://vacciniamodel.com/index.html>  
 Page consultée le 20 mai 2008

## 2. Le génome des Poxvirus

Il s'agit d'une molécule d'ADN double brin, linéaire, de grande taille (130 000 - 300 000 paires de bases ou kb) qui se termine par une boucle en épingle à cheveux à chacune de ses extrémités.

Les gènes situés près du centre du génome sont présents en un seul exemplaire, et sont impliqués dans la réplication du virus ; ils codent pour les enzymes nécessaires à la transcription et à la réplication de l'ADN, et celles nécessaires à la synthèse des protéines structurales du virus. Ils sont essentiels au cycle viral.

Les gènes proches des extrémités sont répétés en tandem, et sont pour la plupart non essentiels à la réplication du virus et à sa survie ; ils codent pour des protéines qui affectent le spectre d'hôte ou la virulence du virus. Ils sont responsables de la pathogénicité du virus. Un des intérêts majeurs des Poxvirus est la possibilité de remplacer ces gènes non essentiels par des transgènes d'intérêt thérapeutique ou vaccinal. La manipulation du génome poxviral est rendue possible par la grande fréquence des recombinaisons génétiques de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  (Pastoret *et al.*, 2003 - 4) et (Moss, 2001 - 5).



### 3. Le cycle infectieux des Poxvirus (Moss, 2001 - 5)

La réplication des Poxvirus est strictement cytoplasmique. Les Poxvirus ont la propriété de produire de grands virions complexes contenant les enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide ribonucléique messager (ARNm). Ils codent pour leur propre ADN et pour leur ARN polymérase; il s'agit donc de virus autonomes.

Le virus ne rentre pas dans les cellules de la même façon selon qu'il est sous la forme IMV ou EEV. Pour la forme IMV, la phase d'adsorption se fait grâce aux récepteurs glycosaminoglycanes avec les ligands A27L, D8 et H3. La nature de ces récepteurs et ligands dans le cas de la forme EEV du virus n'est pas connue. On suppose que le virus pénètre ensuite par endocytose et fusion.

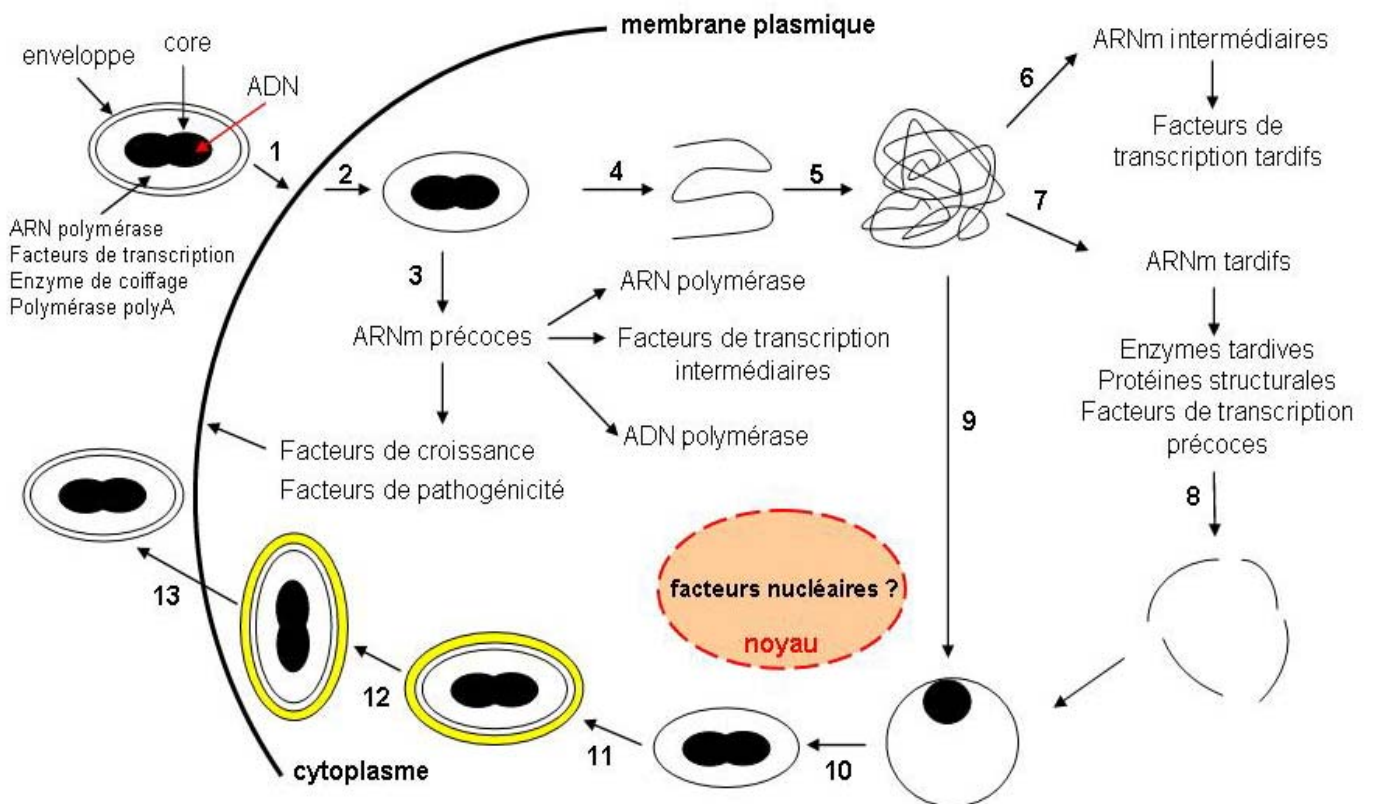
Une fois dans le cytoplasme, certains virus perdent leur(s) enveloppe(s) et entament un cycle de réplication.

Le cycle de réplication est composé de trois phases séquentielles typiques des virus à ADN :

- étape précoce
- étape séquentielle
- étape tardive

Le cycle réplcatif comporte une première phase qui permet, grâce aux enzymes associés aux virions, l'expression de gènes précoces puis la réplication de l'ADN ; les gènes intermédiaires et tardifs sont alors exprimés. Parmi eux se trouvent les gènes codant pour les facteurs précoces de transcription. Les produits de chaque étape servent à l'étape suivante. C'est une réplication en cascade.

Enfin, cela aboutit à la morphogenèse des virions fils (IMV et EEV). Le cycle conduit toujours à la lyse de la cellule; le cycle complet dure 12-24 heures environ. Il est repris figure 6.



**Figure 6 : Cycle de répliation des Poxvirus**

(D'après Moss, 2001 - 5)

Légende :

1. Attachement à la cellule.
2. Pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme.
3. Transcription de gènes précoces.
4. Déshabillage du core.
5. Réplication de l'ADN et formation de concatémères.
6. Transcription des gènes intermédiaires.
7. Transcription des gènes tardifs.
8. Début de l'assemblage avec les premiers fragments de membrane.
9. Résolution des concatémères et incorporation de l'ADN.
10. Maturation et formation des IMV.
11. Acquisition d'une double enveloppe (virus enveloppé intracellulaire).
12. Migration vers la surface cellulaire à l'aide du cytosquelette.
13. Fusion avec la membrane plasmique cellulaire, formation de virus enveloppés associés à la cellule et libération d'EEV.

#### 4. Transmission du virus (Moss, 2001 - 5)

Les Poxvirus sont généralement dermatropes, c'est-à-dire que la transmission s'effectue par passage transcutané, à travers la peau ou la muqueuse présentant des microlésions. Ils sont résistants dans le milieu extérieur, qui peut ainsi servir de relais dans la transmission indirecte. Un cas fréquent de transmission indirecte implique des arthropodes hématophages, vecteurs passifs qui inoculent le virus par voie transcutanée ; c'est en particulier le cas du MYXV, transmis par l'intermédiaire des puces ou des moustiques. Ce mécanisme est important puisqu'il est alors facile d'imaginer les Poxvirus comme vecteurs vaccinaux transmis par une simple inoculation. Par ailleurs, cela justifie de manipuler le MYXV sur lequel porte notre exposé dans un laboratoire de niveau de biosécurité 2.

### **C. Les avantages des Poxvirus en tant que vecteurs viraux vaccinaux**

La **réplication** des Poxvirus est **strictement cytoplasmique**, ce qui facilite l'introduction de gènes étrangers dans le génome viral par recombinaison homologue et transfert de marqueur. Le marquage, la détection et la purification des protéines exprimées sont relativement aisés. Les complications éventuelles d'intégration dans le génome de la cellule hôte sont fortement improbables.

Le génome viral, flexible et de grande taille, tolère facilement **l'insertion de fragments d'ADN étrangers de grande taille** (de plus de 25 kb), et la délétion de séquences virales non essentielles. Ce phénomène permet la création de vaccins multivalents. Contrairement à d'autres virus à ADN plus petits, il n'y a pas de contraintes particulières de taille de la molécule d'ADN nécessaire à la réplication ou à l'encapsidation. Les Poxvirus sont ainsi capables d'accepter des gènes étrangers, de les exprimer et d'induire une bonne immunité après inoculation à un hôte réceptif ; ils sont donc très utilisés sous la forme de Poxvirus infectieux recombinés, en particulier le VACV dans le génome duquel de nombreux gènes issus de microorganismes divers ont été introduits à des fins vaccinales (Messud-Petit *et al.*, 2000 - 6).

Le système de transcription virale est spécifique et la transcription des gènes viraux se réalise de façon quasi **autonome**. Un gène mis sous la dépendance d'un promoteur poxviral sera correctement transcrit au cours du cycle infectieux. Comme les Poxvirus se répliquent dans le cytoplasme et utilisent leur propre système de transcription, leurs promoteurs sont

nécessaires à l'expression des gènes étrangers. Ainsi, il est possible de **décider du moment et du niveau d'expression du gène par le choix d'un promoteur précoce**, intermédiaire ou tardif. Une séquence ADN couramment utilisée comme promoteur, contient en tandem un promoteur précoce et un promoteur tardif, permettant un niveau d'expression continu et modéré du gène étranger (Moss, 1996 - 7).

Les ARNm obtenus seront l'objet d'une **traduction efficace**, permettant la production de la protéine étrangère au sein de la cellule infectée ; les modifications post-traductionnelles de la protéine recombinée sont très proches de celles observées sur la protéine native, et son activité est en général parfaitement conservée.

Les vecteurs poxviraux ont la capacité d'induire une réponse anticorps et une réponse cytotoxique contre des antigènes étrangers avec une **immunité qui est généralement de longue durée** après une seule inoculation dans l'espèce cible.

Ils sont pratiquement **inoffensifs** : le CPXV, puis surtout le VACV, ont été mondialement utilisés avec succès dans les campagnes de vaccination antivariolique. Bien que quelques complications post-vaccinales aient été décrites, le VACV reste très sûr et efficace. Il a permis l'éradication mondiale de la variole.

Le **coût de production** de la plupart des Poxvirus n'est **pas élevé**, et les virus recombinés étant des vaccins vivants, la dose protectrice minimale est faible.

Les Poxvirus sont en général **très stables** : ils supportent bien la congélation, la lyophilisation et la réhydratation sans perte significative du titre infectieux. Cela les rend particulièrement **adaptés à la vaccination de masse**.

Les Poxvirus sont **faciles à administrer**, puisque la voie ID est la méthode classique d'inoculation, et que certains peuvent également être administrés par voie orale. Dans le cas du VACV, il a été démontré que le virus peut être administré *per os* ; cette voie a d'ailleurs été utilisée pour la vaccination des renards et des rats laveurs.

Les vaccins recombinants utilisant des Poxvirus permettent de **distinguer une infection naturelle de la vaccination** dans la mesure où le vecteur recombinant expose une série d'antigènes définis de l'agent pathogène (Pastoret *et al.*, 2003 - 4).

Enfin, des techniques récemment développées permettent d'exploiter le potentiel biochimique et génétique des Poxvirus. Grâce à ces techniques, il est possible d'altérer des séquences précises de gènes ou encore d'induire la régulation de l'expression des gènes (Messud-Petit *et al.*, 2000 - 6).

## **D. Les limites à l'utilisation des Poxvirus**

Les Poxvirus détruisent à terme les cellules qu'ils infectent. Ils ne peuvent donc être utilisés que pour une expression transitoire de la protéine étrangère.

Les membres des différents genres de la famille des *Poxviridae* présentent des similitudes antigéniques. Ceci pose problème dans le sens où si une immunité vis-à-vis du vecteur préexiste, elle réduira considérablement le succès de la vaccination réalisée avec un vecteur Poxvirus homologue. En effet, cette immunité limitera la capacité du virus intrant à atteindre et à infecter le tissu cible ; par conséquent cela diminue l'expression de l'antigène étranger et donc la réponse immunitaire générée contre l'antigène cible. Pour contourner ce problème, il est possible d'utiliser des combinaisons différentes de vecteurs ou de diversifier les voies d'immunisation.

C'est surtout le problème du pouvoir pathogène résiduel, notamment pour la vaccination chez l'homme, qui peut limiter leur emploi en tant que vecteurs vaccinaux. La solution réside dans l'utilisation de Poxvirus à spectre d'hôte étroit ou la maîtrise des facteurs de pathogénicité et l'exploitation de nouvelles souches totalement apathogènes du VACV (Pastoret *et al.*, 2003 - 4) et (Messud-Petit *et al.*, 2000 - 6).

Cela n'empêche cependant pas l'utilisation de ceux-ci en tant que vecteurs vaccinaux, et notamment chez l'Homme. En effet, la capacité des Poxvirus à induire une réponse cytotoxique a conduit à considérer leur utilisation dans le traitement de certains cancers. Expérimentalement, un vaccin recombinant exprimant un antigène associé aux cellules tumorales procure des effets prophylactiques et thérapeutiques contre les tumeurs (Moss 1996 - 7). Compte tenu des nombreux avantages qu'ils présentent en tant que vecteurs vaccinaux, l'utilisation des Poxvirus à spectre d'hôte étroit se poursuit donc avec succès.

## **E. Exemples de vaccins recombinants utilisant des Poxvirus**

### **1. Les *Orthopoxvirus* : le VACV, premier vecteur vaccinal**

Les membres du genre *Orthopoxvirus* présentent un spectre d'hôte étroit ou au contraire très large, comme dans le cas du VACV. Il peut ainsi être utilisé dans de nombreuses espèces comme vecteur vaccinal puisqu'il a été prouvé qu'il peut se répliquer chez de nombreuses espèces de vertébrés, des oiseaux aux mammifères et à l'homme.

En 1980, l'Assemblée générale de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré la variole humaine éradiquée de la surface de la Terre, grâce à la campagne de vaccination mondiale qui a été menée pendant deux siècles en inoculant le VACV à l'homme par voie ID. L'année 1980 a aussi été marquée par l'application de la technologie de l'ADN recombinant au VACV, fournissant les outils nécessaires à la manipulation génétique des Poxvirus et au développement de ceux-ci comme vecteurs vaccinaux contre des maladies sans lien direct avec le vecteur (Pastoret *et al.*, 2003 - 4).

Le VACV est le premier vecteur Poxvirus recombinant à avoir été utilisé. Le vaccin atténué contre la rage est instable et un regain de virulence est toujours à craindre ; le vaccin inactivé est quant à lui inefficace par voie orale, ce qui rend son utilisation difficile dans une campagne de vaccination destinée à des animaux sauvages. C'est pourquoi le vaccin recombinant vaccine-rage est apparu comme le candidat idéal pour la vaccination des renards sauvages contre la rage en Europe. Ainsi, l'administration de VACV exprimant un antigène de surface de la rage, à savoir la glycoprotéine G, entraîne la production d'anticorps neutralisants dirigés contre le RABV, en quantités égales ou supérieures à celles obtenues jusque là avec les vaccins conventionnels. Ainsi,  $10^8$  unités formant plaques (ufp) du vaccin recombinant VVTGgRAB administré par voie orale, confère une protection complète contre l'infection rabique, et son administration ne cause aucun effet secondaire chez les animaux. Ce vaccin a permis la vaccination orale des renards en Europe et a largement prouvé son efficacité et sa sécurité d'utilisation sur le terrain (Blancou *et al.*, 1986 - 8).

En chine, un recombinant composé du VACV exprimant une glycoprotéine membranaire majeure du *Human herpesvirus 4* [HHV-4] ou Epstein-Barr virus [EBV] (virus d'Epstein Barr ou virus de la mononucléose infectieuse) a été développé ; il semble qu'il permet de retarder et de prévenir l'infection chez les enfants (Moss 1996 - 7).

Le VACV représente donc un très bon vecteur vaccinal puisqu'il ne possède pas de réservoir animal à partir duquel le pathogène peut réémerger et qu'une éventuelle épidémie pourrait être circonscrite et contenue rapidement grâce à la vaccination. Aujourd'hui le VACV, dont l'origine est inconnue, n'a plus de réservoir naturel et peut être considéré comme un virus de laboratoire. Il possède un spectre d'infection large, ce qui peut représenter un avantage lors d'études préliminaires sur animaux de laboratoire

Néanmoins, ce large spectre constitue un inconvénient en termes de sécurité de manipulation et d'innocuité pour l'Homme ou pour d'autres espèces. La manipulation du VACV présente un risque à cause de la possibilité d'une infection accidentelle au laboratoire.

Par ailleurs, une utilisation chez l'animal d'un virus pathogène pour l'Homme demeure risquée et elle est déconseillée, même si la sécurité du VACV a été nettement améliorée. Ainsi, le très large spectre d'hôte du VACV représente également une contrainte puisque la transmission d'une espèce cible à une espèce non cible et une possible recombinaison avec un autre Poxvirus, sont à craindre (Paoletti, 1996 - 9).

En effet, les possibilités de recombinaison génétique entre les *Orthopoxvirus* sont grandes à la suite d'une co-infection ; il est donc important d'évaluer la probabilité que le vecteur VACV infecte une cellule déjà infectée par un autre *Orthopoxvirus* en s'intéressant à l'épidémiologie des *Orthopoxvirus* dans la zone de vaccination et à la sensibilité de l'espèce considérée.

Enfin, l'immunité vis-à-vis du vecteur se développe progressivement et peut interférer avec l'efficacité de la vaccination suivante, ou des injections de rappel si un vecteur homologue est utilisé. Pour contourner ce problème, il faut utiliser des combinaisons de vecteurs différentes et des voies d'administration variées.

Voilà pourquoi, malgré l'efficacité dont le VACV a fait preuve en tant que vecteur vaccinal, nous n'avons pas arrêté notre choix sur ce vecteur.

## 2. Les *Avipoxvirus* en tant que vecteurs vaccinaux

Le genre *Avipoxvirus* se compose de virus qui infectent toutes les espèces de volailles et de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages. Ils présentent des similitudes sérologiques entre eux. Les différentes espèces d'*Avipoxvirus* ont des noms en rapport avec leur espèce hôte comme par exemple le CNPV qui infecte certains oiseaux. Les *Avipoxvirus* ont une grande spécificité d'hôte, et ils sont incapables de réaliser un cycle de réplication complet chez des espèces non aviaires. Les souches sauvages peuvent causer des maladies très graves chez leurs hôtes naturels. Certains *Avipoxvirus* peuvent infecter d'autres espèces que leur espèce cible, mais ceci se produit sans conséquences pathologiques. Par exemple, le *Pigeonpox virus* [PGPV] (Poxvirus du pigeon) est naturellement atténué pour le poulet et il a pu être utilisé dans un vaccin contre la grippe aviaire. Ainsi, des souches atténuées d'*Avipoxvirus* peuvent être utilisées pour vacciner les oiseaux (Paoletti, 1996 - 9).

Bien que leur multiplication soit limitée aux espèces aviaires, ces souches atténuées d'*Avipoxvirus* sont apparues comme des vecteurs efficaces et très sûrs pour les mammifères. En effet, il a été montré que l'infection de cellules de mammifères avec un vecteur recombinant utilisant un *Avipoxvirus* aboutit à l'expression du gène étranger et induit une

immunité protectrice. Ainsi, une immunisation peut être réalisée en l'absence de répllication du vecteur, ce qui annihile le potentiel de dissémination du vecteur chez l'animal vacciné et évite par là même, la dissémination du vecteur aux animaux non vaccinés ou à l'environnement en général. Aucune dissémination de l'infection à partir des animaux vaccinés n'est donc à craindre (Tartaglia *et al.*, 1993 - 10). De plus, l'utilisation de ces vecteurs dans des espèces qui ne sont pas des espèces réservoirs d'*Avipoxvirus* rend la probabilité de recombinaison *in vivo* quasiment nulle.

Ces 10 dernières années, un grand nombre de virus recombinants ont été produits en utilisant la souche atténuée ALVAC du CNPV. Ces essais ont démontré l'efficacité et l'innocuité de ce vecteur. Bien que le CNPV ne peut pas se répliquer de manière productive dans les espèces autres que aviaires, il permet, en tant que vecteur, l'expression de facteurs immunogènes étrangers et donc le développement d'une réponse immunitaire lorsqu'il est inoculé à des espèces non aviaires (Tartaglia *et al.*, 1993 - 10).

Ainsi, un vaccin recombinant a été produit avec un vecteur CNPV dans le génome duquel une portion du gène pol codant pour une protéase du *Feline leukemia virus* [FeLV] (virus de la leucose féline) et le gène gag (gène d'enveloppe du sous-groupe A de la souche Glasgow-1) ont été insérés. *In vivo*, l'expression de l'antigène protecteur du FeLV entraîne une forte réaction immunitaire, qui est particulièrement adaptée à la stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, et qui semble jouer un rôle majeur dans la guérison naturelle de l'infection et dans l'immunité vaccinale (Tartaglia *et al.*, 1993 - 10) et (Merial - 11). La vaccination avec le vaccin recombinant CNPV-FeLV permet l'expression d'antigènes viraux immunogènes de la même manière que l'infection naturelle peut le faire, sans répllication virale productive (Grosenbaugh *et al.*, 2006 - 12).

A la suite d'une injection sous-cutanée, il induit même une protection après une épreuve avec inoculation par voie mucosale. La protection obtenue avec une dose de vaccin inactivé suivie d'une dose de vaccin recombinant trois semaines plus tard, est similaire à celle obtenue avec le protocole classique constitué par deux injections de vaccin inactivé. C'est un vaccin efficace, qui allie efficacité et innocuité (Merial - 11). Il s'agit du premier vaccin recombinant efficace contre un Rétrovirus.

La capacité à induire une protection vis-à-vis d'une épreuve par voie mucosale a également été observée pour d'autres vaccins recombinants utilisant un *Avipoxvirus* comme



vecteur. C'est le cas du vaccin contre la maladie de Carré ou encore du vaccin contre la grippe équine qui contiennent tous les deux, un CNPV (Tartaglia *et al.*, 1993 - 10).

Le développement d'un vaccin contre la grippe équine repose sur l'utilisation de CNPV comme vecteurs, vCP1529 et vCP1533 correspondant à des CNPV recombinants, exprimant les hémagglutinines de deux souches de virus grippaux équins. Le premier exprime l'hémagglutinine du *Influenza A virus* [FLUAV] souche A2/Kentucky/94 (H<sub>3</sub>N<sub>8</sub>), et le second l'hémagglutinine du FLUAV souche A2/Newmarket/93 (H<sub>3</sub>N<sub>8</sub>). Bien qu'ils expriment un gène de la grippe équine associé à la réponse protectrice, ils ne se multiplient pas chez les chevaux. Ce vaccin induit une forte réponse immunitaire à médiation cellulaire, qui semble jouer un rôle majeur dans la guérison naturelle de l'infection et dans l'immunité vaccinale (Merial - 13). Il a été rapporté que les chevaux vaccinés ont généralement des signes cliniques nettement atténués et qu'ils se débarrassent du virus plus rapidement que les chevaux non vaccinés. Une immunité spécifique de la grippe équine s'est développée chez les chevaux vaccinés. Il s'agit donc d'un vaccin efficace et sûr grâce à la très grande spécificité d'hôte et à la stabilité génétique du vecteur (Paillot *et al.*, 2006 - 14).

Un tel vecteur pourrait être pertinent dans la préparation de vaccins contre d'autres Rétrovirus, dont le *Human immunodeficiency virus* [HIV] (virus de l'immunodéficience humaine). Des essais avec un recombinant CNPV incluant une glycoprotéine du HIV, ou encore un recombinant utilisant le VACV comme vecteur exprimant un gène d'enveloppe du HIV, ont permis le développement d'une réponse cellulaire et humorale (Moss, 1996 - 7).

### 3. Le MYXV en tant que vecteur vaccinal

Le genre *Leporipoxvirus* appartenant à la famille des *Poxviridae*. Il contient cinq espèces, mais seul le MYXV présente un intérêt vétérinaire. Il figure parmi les plus gros virus animaux. Avec un génome de 160 kb environ, il contient une séquence de plus de 150 protéines, parmi lesquelles des facteurs lui permettant de s'adapter aux conditions dysgénésiques créées par l'hôte en bloquant l'action des régulateurs des réponses immunitaire et inflammatoire.

La spécificité des récepteurs de cytokines codés par les Poxvirus rend compte de leur hôte naturel. Le MYXV présente une **spécificité d'hôte très étroite** pour le lapin européen. Cette spécificité repose sur un groupe de protéines définissant le spectre d'hôte du MYXV (myxoma host range ou MHR) qui ont en commun des séquences répétées d'une trentaine

d'acides aminés ou motifs ankyrines. Cette notion de **spectre d'hôte** est très importante lorsque l'on considère les Poxvirus comme vecteurs de gènes étrangers.

Deux maladies virales constituent un danger majeur pour les populations de lapins européens : la myxomatose et la maladie hémorragique virale du lapin. Le virus responsable de cette maladie appartient à la famille des *Caliciviridae*, il s'agit du *Rabbit viral hemorrhagic disease virus* [RHDV] (virus de la maladie hémorragique virale du lapin). Pour prévenir ces maladies, la vaccination semble particulièrement indiquée. Les vaccins antimyxomateux à virus atténué et anti-RHDV à virus inactivé, qui sont disponibles sur le marché sont efficaces, mais possèdent des défauts qui rendent leur utilisation coûteuse ou peu aisée. Afin d'améliorer l'efficacité des vaccins existant contre le RHDV, la protéine majeure de capsid VP60 a été exprimée dans un système recombinant vivant du type Poxvirus (Messud-Petit *et al.*, 2000 - 6). Certains Poxvirus utilisés comme vecteurs vaccinaux présentent l'avantage de protéger contre le virus dont ils expriment l'antigène, mais également contre la maladie induite par le vecteur lui-même. En utilisant un vaccin recombiné MYXV-RHDV, on peut ainsi vacciner simultanément les lapins contre la myxomatose et la maladie hémorragique virale du lapin.

La souche vaccinale atténuée SG33 a été obtenue à partir d'un MYXV dont la virulence a été atténuée par passages en série avec clonages, successivement sur cellules rénales de lapin et cellules d'embryon de poulet, à basse température, par Saurat et Gilbert en 1978 (Saurat *et al.*, 1978 - 15). Il semble possible, en choisissant des sites de recombinaison appropriés, d'améliorer l'innocuité de la souche atténuée SG33 du MYXV pour les jeunes lapins en inactivant des gènes codant pour des facteurs de pathogénicité tels que les gènes TK ou M11L et le gène du facteur de croissance du MYXV (myxoma growth factor ou MGF). L'immunogénicité de la souche myxomateuse vaccinale SG33 ne semble pas avoir été modifiée par l'insertion d'un gène étranger dans le locus M11L-MGF. Le virus recombiné MYXV-RHDV exprime correctement la protéine de capsid du RHDV et une seule injection ID de ce vaccin recombinant protège les jeunes lapins contre les virus sauvages de la maladie hémorragique virale du lapin et de la myxomatose (Bertagnoli *et al.*, 1996 - 16). Les travaux menés jusqu'ici pour améliorer la vaccination du lapin européen nous confortent dans l'idée que le MYXV représente un vecteur poxviral intéressant dont l'application vaccinale mérite d'être testée chez d'autres espèces de mammifères.

Ainsi, un vaccin recombiné mettant en jeu un MYXV atténué exprimant une protéine de capsid du *Feline calicivirus* [FCV] (calicivirus félin) a été produit. Les gènes de capsid du FCV ont été insérés dans le locus du MGF, dans le génome du MYXV et sont exprimés grâce à des promoteurs de Poxvirus artificiels. Le MYXV est incapable de se répliquer de manière productive dans les cellules de chat *in vitro* ; néanmoins, les cellules infectées avec le virus recombiné expriment les antigènes hétérologues à partir des promoteurs artificiels précoces et tardifs. Les chats immunisés à l'aide de ce vaccin ont produit des anticorps neutralisants en grande quantité et ont été protégés contre l'infection par le FCV sauvage. De plus, aucune transmission du virus recombiné MYXV-FCV des chats vaccinés aux chats non vaccinés n'a été mise en évidence. Ces résultats démontrent le potentiel du MYXV comme vecteur vaccinal. Aucune espèce sauvage ou domestique du lapin européen n'est sensible au MYXV atténué et il présente une très grande sécurité d'utilisation chez les espèces non cunicoles (McCabe *et al.*, 2002 - 17).

➤ Avantages du MYXV comme vecteur vaccinal :

Un vaccin recombiné, qui utiliserait comme vecteur le MYXV pour protéger les ruminants contre la FCO en Europe présenterait l'avantage d'utiliser comme vecteur un virus qui existe déjà de manière endémique en Europe, et son utilisation ne risque pas d'introduire un nouveau virus sur le territoire européen.

Par ailleurs, les *Leporipoxvirus*, contrairement au VACV, ont un spectre d'hôte très restreint et ne sont pas pathogènes pour l'homme ou pour les autres espèces de mammifères. Ainsi, le choix d'un vecteur avec un spectre d'hôte étroit tel que le MYXV, limite la dissémination du vecteur et réduit la probabilité d'un échange de gènes avec un pathogène sauvage (Bertagnoli *et al.*, 1996 - 16).

La connaissance des facteurs de virulence du MYXV permet de supprimer spécifiquement les gènes concernés afin de créer un mutant totalement apathogène.

Ces facteurs, associés aux nombreux avantages que possèdent les Poxvirus, font du MYXV un excellent vecteur vaccinal et nous ont conduits à le choisir comme vecteur vaccinal dans ce projet.

### **III. Vacciner contre la FCO : pourquoi et comment ?**

#### **A. La maladie, sa distribution, sa propagation dans l'hémisphère nord**

##### 1. La FCO : généralités

Il s'agit d'une maladie infectieuse, non contagieuse, transmise par piqûre d'un diptère hématophage du genre *Culicoides* à des animaux réceptifs, après un repas de sang infectant sur un ou des animaux virémiques. La FCO appartient à la liste A de l'Office international des épizooties (OIE) (<http://bluetongue.cirad.fr>, 2008 - 18). Au départ c'était une maladie plutôt exotique dont la zone endémique ne cesse de s'élargir au détriment de l'Europe occidentale. La FCO est due au BTV qui est un des sérogroupes du genre *Orbivirus* au sein de la famille des *Reoviridae*. Le séro groupe du BTV regroupe 24 sérotypes.

La FCO affecte de nombreuses espèces de ruminants sauvages ou domestiques, et notamment les ovins qui sont plus sensibles que les caprins ou les bovins, souvent porteurs asymptomatiques. L'*Epizootic hemorrhagic disease virus* [EHDV] (virus de la maladie hémorragique des cervidés) peut provoquer une maladie clinique chez les ruminants sauvages ou domestiques, identique à celle provoquée par le BTV (Niang, 2005 - 19).

Les conséquences cliniques de l'infection varient de la forme asymptomatique chez la grande majorité des animaux infectés à des formes létales ; de telles variations sont liées à des variations du pouvoir pathogène en fonction des sérotypes ou des souches du virus, des vecteurs impliqués, de l'espèce et de la race des animaux infectés.

La FCO provoque, dans le cas de la forme aiguë, une réaction fébrile associée à des manifestations inflammatoires et congestives. Des lésions œdémateuses et hyperhémiques, voire hémorragiques apparaissent, en particulier au niveau de la face et des muqueuses de l'oropharynx (Albina *et al.*, 2007 - 20). Dans les formes sévères, la langue présente des lésions de congestion très marquées, elle devient œdémateuse et fait protrusion hors de la bouche. L'inflammation cutanée peut provoquer des pertes de laine. Une dégénérescence musculaire provoque du torticolis ou une raideur de la démarche, et l'avortement est possible à la suite d'une infection transplacentaire du fœtus. L'infection durant la gestation provoque non seulement l'avortement mais elle a aussi des effets tératogènes chez le fœtus. Ainsi, les animaux infectés, s'ils ne meurent pas, deviennent assez rapidement des non-valeurs

économiques et les pertes pour l'éleveur peuvent être considérables, en particulier en élevage ovin. Cette forme se rencontre principalement chez les ovins vivant dans les régions où l'infection apparaît pour la première fois ou dans certaines races, avec un taux de morbidité très élevé (80 à 90 %) et un taux de mortalité qui peut atteindre 30 à 50 %. Les bovins et les caprins développent le plus souvent une forme asymptomatique après infection par le BTV.

En revanche, l'épisode récemment apparu en Europe du nord est associé à une sensibilité accrue des bovins ; il est lié au sérotype 8 du BTV (Niang, 2005 - 19).

## 2. Pathogénie

Un arthropode du genre *Culicoides* prend un repas sanguin. Le virus, qui a atteint les glandes salivaires en six à huit jours après une phase de réplication, est ensuite transmis à un hôte vertébré. A partir du point d'entrée transcutané, le virus atteint le ganglion lymphatique adjacent où il se réplique puis diffuse par voie lymphatique et hématique à l'ensemble des organes et des tissus. Il infecte les cellules endothéliales vasculaires, les macrophages et les cellules dendritiques. Le tropisme du virus est dirigé vers les cellules endothéliales ; il se localise dans les poumons, les muqueuses, le muscle ou encore le bourrelet coronaire de l'onglon et a pour conséquence des thromboses vasculaires et des nécroses ischémiques des tissus irrigués. Ce phénomène est à l'origine des lésions d'ulcération buccale, de nécrose musculaire et de microhémorragies (pétéchies). Ces propriétés lui confèrent un pouvoir pathogène important (Niang, 2005 - 19) et (Albina *et al.*, 2007 - 20).

L'infection naturelle produit une virémie prolongée jusqu'à 11 jours chez les ovins, et 49 jours chez les bovins, ce qui facilite la transmission par les arthropodes. Des virémies de plus longue durée ont même été décrites avec les sérotypes présents en France. La transmission via le vecteur est possible jusqu'à 21 jours après l'infection chez les bovins. Le virus circule associé aux cellules blanches et rouges du sang au début de l'infection, puis il est presque exclusivement associé aux globules rouges durant la phase tardive. Cette association favorise peut être la persistance du virus et sa transmission aux diptères hématophages (Niang, 2005 - 19).

### 3. Epidémiologie

#### *a. Epidémiologie descriptive*

La matière virulente est le sang. La virémie apparaît rapidement après l'inoculation ; elle est associée à des titres élevés pendant de longues durées. Ainsi, si le vecteur est présent, la propagation est très rapide. Tout animal infecté (même asymptomatique) devient une nouvelle source infectante.

Durant la phase de virémie, le virus peut également être isolé dans le sperme. Le virus est assez résistant, notamment au froid ; il est donc bien conservé dans les paillettes utilisées pour l'insémination artificielle.

En outre, chez les bovins, il est possible d'isoler le virus, plus de deux ans après la naissance d'individus infectés *in utero* (rôle de réservoir) (Niang, 2005 - 19).

#### *b. Epidémiologie analytique : vecteur et transmission de la maladie*

Seuls les membres du genre *Culicoides* sont d'authentiques vecteurs biologiques (<http://bluetongue.cirad.fr>, 2008 - 18). Ce sont des diptères hématophages (seule la femelle est hématophage) appartenant à la famille des *Cératopogonidae*. Seules 17 espèces parmi les 1254 répertoriées ont été incriminées dans la transmission du BTV ; *C. imicola* fait partie des espèces principales qui sont avérées ou fortement suspectées d'être des vecteurs du BTV. Cette espèce existe en Europe. Cependant, des foyers de FCO ont été déclarés dans des régions d'Europe du Nord où *C. imicola*, le vecteur principal du virus en Europe du sud, n'a encore jamais été identifié ; ceci suggère qu'un nouveau vecteur a pris le relais : probablement des espèces européennes locales telles que *C. obsoletus* ou *C. scoticus* (Albina *et al.*, 2007 - 20).

En outre, la question du passage transovarier du virus chez les *Culicoides* reste posée, mais à ce jour aucune preuve n'a été apportée. La transmission mécanique par d'autres arthropodes est également possible.

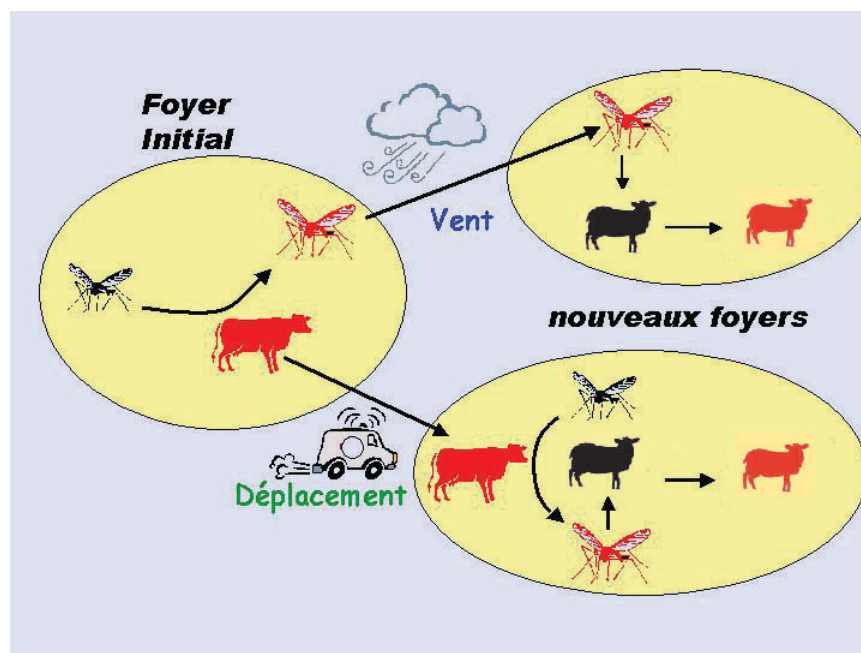
Au final, la connaissance de la dynamique des vecteurs responsables de la transmission du BTV est assez restreinte ; néanmoins, la transmission se fait presque exclusivement par les vecteurs *Culicoides* ; la transmission par un animal infecté à un autre animal par contact direct est exceptionnelle, même si des contaminations orales par ingestion des annexes fœtales ont été rapportées. Des cas de transmission par voie vénérienne ou par

transfert d'embryons ont été décrits, mais ils restent anecdotiques sur le plan épidémiologique.

### *c. Cycle épidémiologique du BTV*

La température joue un rôle dans la capacité vectorielle (capacité du vecteur à transmettre l'infection) des espèces de *Culicoides*. La réplication virale n'est possible qu'au dessus de 15 degrés Celsius (°C), et n'est pas suffisante pour une éventuelle transmission. Ainsi, cette maladie ne survient, sous nos latitudes, que durant les périodes chaudes de l'année. Les bovins sont probablement responsables du transhivernage (persistance du virus pendant l'hiver) et donc de la pérennisation de l'infection. Les arthropodes se multiplient au printemps (pas d'activité en dessous de 15 °C) et piquent les bovins, chez lesquels le virus a persisté pendant l'hiver, puis la maladie est transmise des bovins aux ovins qui expriment la maladie (<http://bluetongue.cirad.fr>, 2008 - 18). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ , particulièrement abondants chez les ruminants, pourraient être incriminés dans la persistance du virus au sein de la peau. La réponse inflammatoire intense résultant des piqûres de *Culicoides* recruterait et activerait ces lymphocytes dans le derme de la peau, permettant alors un cycle de réplication viral important et favorisant la transmission du virus aux vecteurs lors des repas de sang suivants. Ce mécanisme pourrait contribuer à la persistance du virus chez l'animal au cours de l'hiver dans les régions les plus septentrionales, lorsque les *Culicoides* ne sont plus actifs pendant plusieurs semaines consécutives (Albina *et al.*, 2007 - 20).

La figure 7 illustre le cycle épidémiologique de la FCO et évoque les mécanismes de dissémination du virus à travers le déplacement des insectes vecteurs avec le vent et l'intervention de l'Homme.



**Figure 7 : Cycle épidémiologique de la FCO**

[http://agriculture.gouv.fr/guide\\_epizooties/monographies/c-fcm.htm](http://agriculture.gouv.fr/guide_epizooties/monographies/c-fcm.htm)  
Page consultée le 10 mai 2008

#### 4. L'arrivée de la FCO en France

Décrite pour la première fois en 1881 en Afrique du Sud, la FCO s'est étendue à partir de 1940 en Afrique centrale pour atteindre ensuite le bassin méditerranéen. A l'heure actuelle, elle est également signalée en Amérique du Nord, en Amérique centrale, en Amérique du Sud, en Australie et en Nouvelle Zélande. Traditionnellement, elle est signalée sur tous les continents dans une zone comprise au nord entre le 40<sup>ème</sup> et le 50<sup>ème</sup> parallèle et au sud entre le 20<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> parallèle, mais tous les sérotypes n'y sont pas représentés de façon identique.

En Europe, la FCO a déjà fait incursion à trois reprises (au Portugal et en Espagne de 1857 à 1960, à Chypre en 1977 et en Grèce en 1980 sur l'île de Lesbos) mais l'efficacité des mesures défensives (abattage des animaux infectés, désinsectisation...), ainsi que les conditions climatiques peu favorables à la survie du vecteur ont contribué à son éradication.

Plus récemment, en 1998, cette maladie a fait son apparition dans les îles grecques du sud de la mer Egée. En 1999, des cas ont été enregistrés en Grèce, en Bulgarie, en Tunisie et en Turquie ; en 2000 en Tunisie, en Algérie, en Italie (Sardaigne, Sicile et Calabre), en Espagne (îles Baléares), à nouveau en Grèce et finalement en Corse (où 49 foyers ont été enregistrés). La maladie s'est installée durablement en Italie et en Corse. Elle a été dans un



premier temps contrôlée en 2001 en Espagne puis réintroduite depuis le Maroc. En 2004, le Portugal a également été concerné en lien avec les foyers espagnols. Elle s'est également étendue au nord et a sévi en Bulgarie, au Kosovo et en Serbie.

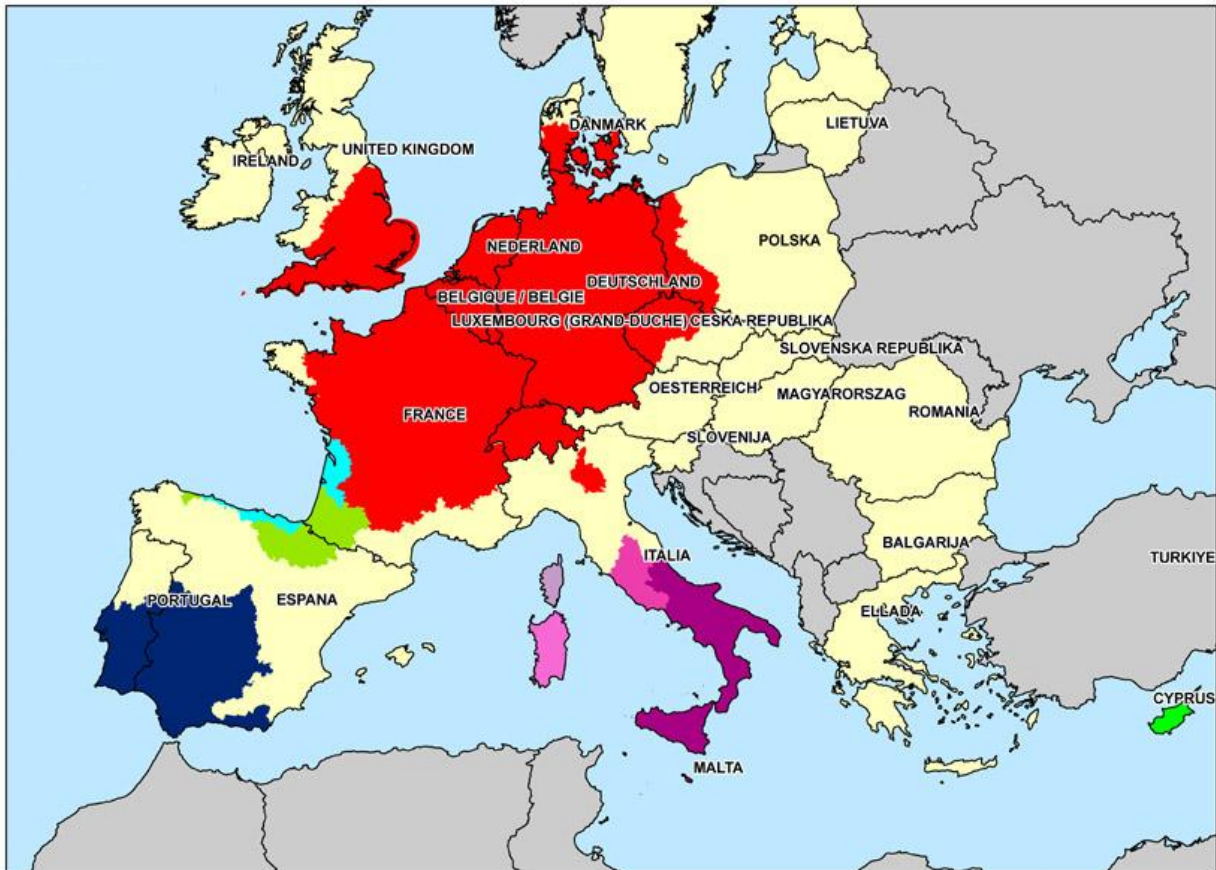
Alors qu'elle a fait son apparition dans le sud de l'Europe (Grèce, Italie, Espagne et Corse) où plusieurs sérotypes ont été identifiés (1, 2, 4, 9 et 16) (<http://agriculture.gouv.fr/>, 2009 - 21) ; en **août 2006**, plusieurs dizaines de foyers ont été diagnostiqués pour la première fois dans le **nord de l'Europe** : en Allemagne, en Belgique, aux Pays-Bas, au Luxembourg et enfin en **France (Meuse et Ardennes : 7 foyers)**. Ces nouveaux foyers ont été caractérisés par l'apparition d'un nouveau sérotype : le sérotype 8. Celui-ci s'est largement répandu sur le territoire communautaire au cours de l'année 2007 et 2008. En 2007, le sérotype 1 a également fait son apparition en France continentale (Dominguez, 2009 - 22). La carte 1 rend compte de la propagation de la FCO en Europe du nord le 7 mai 2008.

Dans le cas particulier de la France, le sérotype 8 qui est apparu en 2006 le long des frontières du Nord-Est, a gagné un an plus tard 64 départements ; puis, le virus majoritairement actif dans le Nord-Est en 2007 (75 % des foyers recensés dans 16 départements de cette zone) a conquis le reste du territoire en 2008 en atteignant 86 départements. Le sérotype 1 a été introduit en France en novembre 2007, via le nord de l'Espagne. Les foyers sont restés concentrés dans le Sud-Ouest, l'Ariège et la Haute Garonne totalisant 50 % des foyers. En 2009, des traces de circulation du BTV 1 ont pu être décelées au cours de la période d'inactivité vectorielle (celle-ci s'étant achevée le 11 mars 2009). On peut observer sur la carte 2 la localisation des résultats positifs en BTV 1 et BTV 8 le 19 septembre 2008 (<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article356>, 2009 - 23).

Les raisons des changements de l'épidémiologie de la FCO sont complexes mais on suppose qu'elles sont liées à de récentes extensions de la distribution de son vecteur principal, à l'adaptation du virus à de nouveaux vecteurs non identifiés mais pérennes en Europe septentrionale et à la présence d'un réservoir permettant au virus de persister pendant l'hiver en l'absence de vecteurs adultes. Le lien entre le réchauffement climatique et l'augmentation de l'aire de distribution du vecteur est fortement suspecté.

Ainsi, la modélisation géographique des biotopes favorables à l'installation de ce vecteur identifie toute l'Europe du sud, en particulier une grande partie du sud de la France,








comme zone à risque. Par ailleurs, l'émergence de foyers est probablement liée à l'introduction d'un animal virémique suivi d'une transmission locale par de nouveaux vecteurs endémiques non encore identifiés. Dans les deux cas, l'extension de cette infection d'origine «tropicale», est liée à l'activité humaine ; elle est la conséquence de la globalisation des activités et de leurs effets secondaires (Albina *et al.*, 2007 - 20).

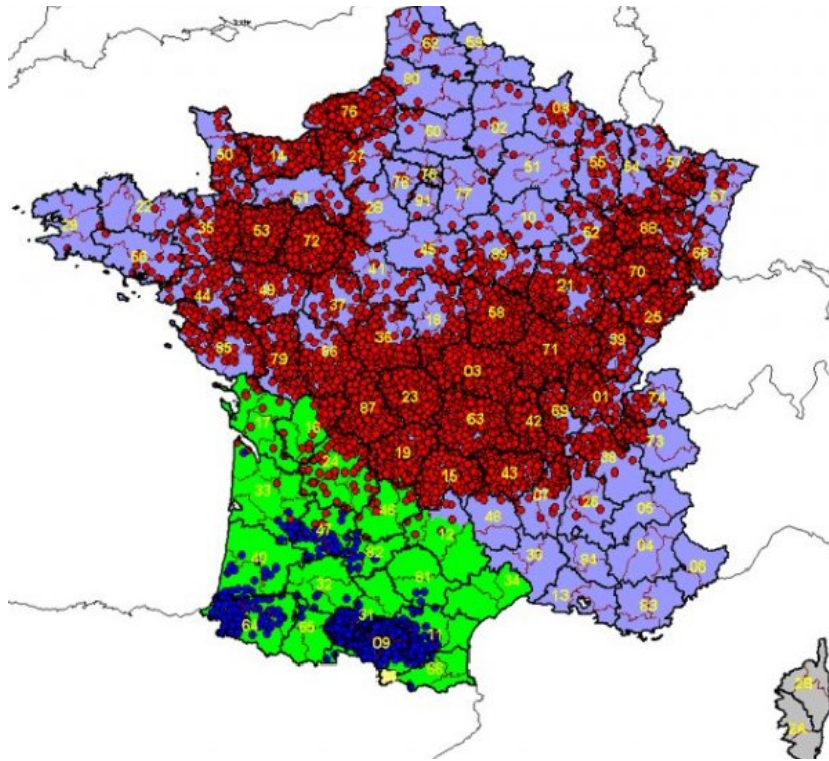


**Carte 1 : Propagation de la FCO en Europe : situation au 7 mai 2008**

[http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm)  
Page consultée le 15 septembre 2009

Légende :

	Sérotype 8		Sérotype 2, 16, 4, 1
	Sérotype 8, 1		Sérotype 2, 16, 4, 9
	Sérotype 4, 1		Sérotype 2, 16
	Sérotype 1		Sérotype 2, 16, 4
	Sérotype 16		



**Carte 2 : Situation en France continentale au 19 septembre 2008**

<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article256>  
Page consultée le 15 septembre 2009

Légende :

- Rond rouge : Foyer de FCO BTV8 dû à la circulation virale 2008
- Rond bleu : Foyer de FCO BTV1
- Zone en bleu : Zone réglementée BTV8
- Zone vert : Zone réglementée BTV 1 et 8
- Zone en jaune : Extension de la zone réglementée BTV 1 et 8
- Zone en gris : Zone réglementée BTV 1-2-4-16

## 5. Prophylaxie

### *a. Prophylaxie sanitaire*

La surveillance virologique est assurée par le piégeage des arthropodes pour surveiller l'apparition de *C. imicola* et par le prélèvement de bovins sentinelles. Des enquêtes sérologiques et entomologiques ont été organisées dans les départements du littoral méditerranéen.

L'efficacité de la lutte antivectorielle est limitée. Les bains ou les douches d'insecticides peuvent réduire les piqûres, l'association des ovins avec des bovins peut être intéressante pour réduire la pression sur l'espèce sensible, mais inapplicable en pratique

Dans les foyers récents et limités, l'abattage est une solution recommandée, qui a permis l'éradication au sud de l'Espagne et dans l'Ile de Lesbos. Outre le fait qu'elle est de moins en moins bien acceptée, cette solution n'est applicable qu'à des foyers très restreints.

Cependant, compte tenu du caractère vectoriel de la FCO, l'efficacité des mesures de contrôle sanitaire est limitée. La vaccination est actuellement le meilleur moyen de prévention contre cette maladie vectorielle.

### *b. Prophylaxie médicale*

Dès l'identification de la présence du BTV en Corse, les services vétérinaires français ont pris la décision de mettre en œuvre une prophylaxie médicale. Ainsi, une campagne de vaccination à l'aide d'un vaccin monovalent à virus atténué contre BTV 2 a été organisée, après l'isolement et le typage du virus responsable des premières épizooties en 2000 dans cette région (Hunter *et al.*, 2001 - 24). Après deux campagnes de vaccination en 2000 et 2001, celui-là n'a plus été ré-isolé lors des épizooties à BTV 4 et BTV 16 de 2003 et 2004. En 2004, des campagnes similaires ont été réalisées contre les sérotypes 4 et 16 toujours avec des vaccins à virus atténué. En décembre 2004, l'utilisation du vaccin à BTV 16 atténué a été suspendue, suite à l'apparition, dans les élevages ovins vaccinés, de signes cliniques évocateurs de la maladie. La mauvaise atténuation du vaccin semblait en être la cause. L'utilisation d'un vaccin vivant peut en effet présenter un certain nombre de risques (Albina *et al.*, 2007 - 20).

Depuis 2004, les autorités françaises ont préconisé l'utilisation de vaccins à virus inactivé. En France les animaux sont aujourd'hui vaccinés à l'aide de vaccins inactivés de sérotype 1 et 8 : la campagne de vaccination 2008/2009 a débuté le 15 décembre 2008. Le 14 mai 2009, le nombre de doses commandées atteignait pour les petits ruminants: 4,2 millions contre BTV 8 et 8 millions contre BTV 1 (<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article356>, 2009 - 23).

D'autres vaccins, utilisant des antigènes composés de pseudo particules constituées des protéines de structure VP2-VP5 ou basés sur des vaccins recombinants utilisant des vecteurs comme le VACV, le CNPV ou un Baculovirus, ont donné des résultats prometteurs mais ne sont pas encore commercialisés.

Compte tenu de la diversité antigénique du BTV, la vaccination contre un sérotype à l'aide d'un vaccin à virus atténué ou inactivé monovalent n'engendre pas de protection

croisée vis à vis des 23 autres sérotypes. La vaccination contre plusieurs sérotypes nécessite l'utilisation de plusieurs sérotypes atténués ou inactivés en mélange.

Des vaccins de nouvelle génération permettant de vacciner contre plusieurs sérotypes sont à l'étude. Ils seraient basés sur l'expression d'antigènes conservés parmi les sérotypes, comme la protéine VP7 par exemple.

## **B. Le BTV**

Le BTV appartient au genre *Orbivirus* au sein de la famille des *Reoviridae* qui est caractérisée par un large spectre d'hôte. Les *Orbivirus* sont isolés de nombreuses espèces animales, y compris l'Homme, et sont répandus dans le monde entier. S'ils sont responsables de maladies mineures en médecine humaine, la sévérité des maladies qu'ils provoquent est en revanche plus grande en médecine vétérinaire. Deux grandes maladies vétérinaires appartiennent au groupe des *Orbivirus*. Il s'agit de deux arboviroses, c'est-à-dire qu'elles sont transmises par des arthropodes, la peste équine (african horse sickness ou AHS) et la FCO à laquelle nous nous intéressons (Niang, 2005 - 19).

Quatorze sérogroupes sont décrits au sein du genre *Orbivirus*. Les sérogroupes sont différenciés à l'aide d'épreuves immunologiques qui détectent des protéines virales conservées chez les virus d'un même séro groupe. Les virus d'un même séro groupe possèdent un antigène commun qui leur confère une réactivité croisée en fixation du complément. La plupart des sérogroupes sont distincts sur le plan antigénique, mais il existe de nombreuses réactions croisées entre les virus des sérogroupes du BTV et de l'EHDV.

Le séro groupe du BTV contient **24 sérotypes**. Le sérotype est spécifique d'une ou de quelques espèces. Une même espèce peut être infectée par plusieurs sérotypes. Le sérotype de chaque virus au sein d'un séro groupe est défini à l'aide des techniques de séroneutralisation virale puisque les antigènes spécifiques de type induisent la production d'anticorps neutralisants.

Il s'agit d'un virus de petite taille (60 à 80 nanomètres ou nm), de forme icosaédrique, non enveloppé, mais dont la capsid est constituée de deux couches protéiques. C'est un virus à ARN double brin, linéaire et contenu dans 10 segments de taille variable. La taille du génome total est d'environ 19 200 bases. La masse molaire du génome varie de

12 à 20.10<sup>6</sup> daltons (Da). La segmentation du génome rend les réassortiments possibles lors de co-infections par plusieurs souches du virus (Niang, 2005 - 19).

### 1. Cycle de multiplication virale du BTV (Figure 8)

Le mode de pénétration du virus dans la cellule nécessite la perte des protéines les plus externes de la capside. Les protéines de la capside sont digérées à l'extérieur de la cellule après reconnaissance du récepteur ou pendant l'endocytose. L'acidification de la vésicule d'endocytose complète la lyse de la capside et le core est ensuite libéré dans le cytoplasme. Il existe essentiellement trois phases de réplication des protéines virales :

- La transcription et la traduction précoces, qui permettent la synthèse des protéines virales qui sont nécessaires à la poursuite du cycle.
- La réplication du génome.
- La transcription et la traduction tardives.

On observe en parallèle une multiplication du génome ainsi que la transcription et la traduction des protéines virales de la capside. Les assemblages génome-capside aboutissent à la formation de corps d'inclusion qui sont ensuite libérés après la lyse de la cellule par apoptose ou par le fait de facteurs extérieurs.

Les possibilités de variation génique sont grandes ; elles engendrent une forte variabilité de l'antigénicité et du pouvoir pathogène (Niang, 2005 - 19).

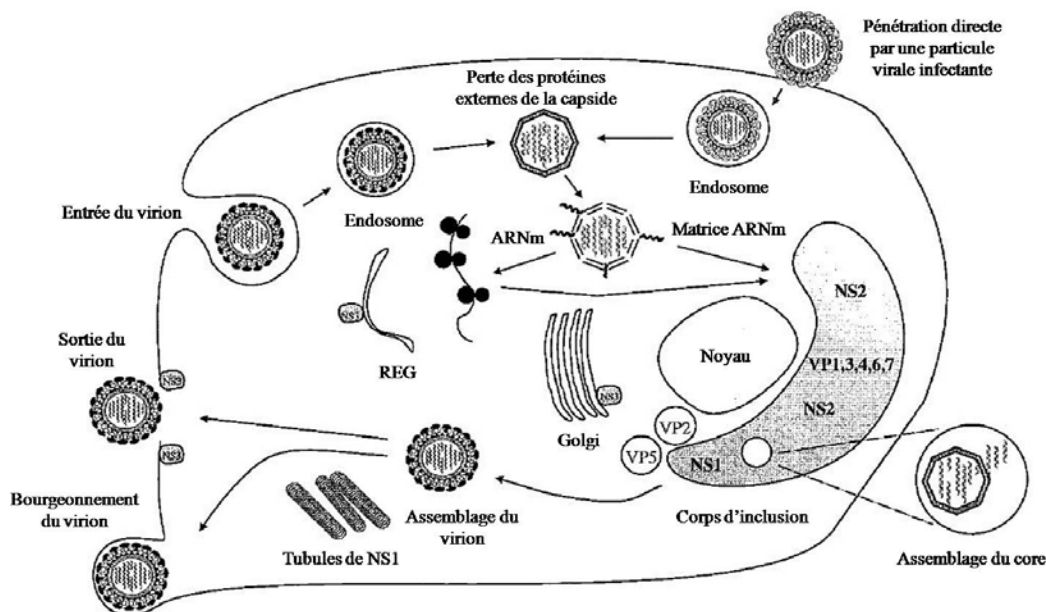


Figure 8 : Cycle de réplication d'un *Orbivirus*

(D'après Roy, 1996 - 26)

## 2. Les protéines du BTV

Malgré la forte ressemblance du génome ARN du BTV avec celui des autres *Reoviridae*, il se distingue par la structure protéique de sa capside. La capside externe du BTV est diffuse et non structurée, alors que la couche protéique interne a une morphologie caractéristique ; elle est constituée d'unités structurales agglomérées en capsomères. Cette différence de la structure des protéines de la capside et de la couche protéique interne reflète les spécificités biologiques et physiques qui caractérisent le BTV (Verwoerd *et al.*, 1972 - 25).

La couche protéique interne, qui se nomme le core, est composée de deux protéines majeures : VP3 et VP7. Le core entoure trois protéines mineures : VP1, VP4 et VP6, ainsi que le génome du virus composé de 10 segments d'ARN double brin. Chaque segment du génome code pour une protéine.

La couche externe, ou capside, comporte deux autres protéines majeures : VP5 et VP2 ; cette dernière est le support principal du déterminisme antigénique de la spécificité de sérotype.

En plus des sept protéines structurales, quatre protéines non structurales sont synthétisées par les cellules infectées : NS1, NS2, NS3 et NS3A (Verwoerd *et al.*, 1972 - 25) et (Roy, 1996 - 26).

### *a. Les cinq protéines du core (Figure 9)*

- Les trois protéines mineures du core : VP1, VP4 et VP6

Ces protéines forment ensemble, avec les 10 segments d'ARN, une grande partie du core. Ces trois protéines sont très conservées entre les différents sérotypes du BTV.

**VP1** est un composant de la polymérase et est impliquée dans l'élongation de l'ARN, elle initie la transcription lorsqu'elle est munie du substrat adapté.

**VP4** est probablement la guanylyl transférase du BTV.

**VP6** présente un motif commun aux hélicases. Une telle activité est probablement impliquée dans le déroulement de l'ARN double brin du génome, avant la synthèse de l'ARNm (Roy, 1996 - 26).

Ces trois protéines forment donc le **complexe de transcription**. Ces dernières sont disposées à la face interne de la capside formée par VP3, au niveau des pores situés aux 12 sommets de la particule à symétrie icosaédrique. Elles forment une structure en forme de fleur

dans le cœur de la particule virale, autour de laquelle s'enroulent les segments d'ARN. Ces derniers apparaissent en quatre couches concentriques dans le cœur de la particule virale lorsque l'observation est faite selon l'axe de symétrie passant par deux sommets de la particule (*Albina et al.*, 2007 - 20).

- Les deux protéines majeures du core : VP3 et VP7

**VP3** est la plus grosse des deux protéines ; elle forme un « échafaudage » interne qui soutient la couche externe du core constituée par VP7. VP3 incorpore et interagit également avec les trois protéines mineures du core dont elle permet l'assemblage. Il s'agit de la protéine la plus conservée entre tous les sérotypes et entre les membres du genre des *Orbivirus* notamment EHDV-1 et *African horse sickness virus 4* [AHSV 4] (virus de la peste équine sérotype 4), aussi bien du point de vue de la séquence en acides aminés que de la fonction. Elle possède des déterminants spécifiques de groupe.

**VP7** est plus abondante que VP3 et c'est le principal composant du core. VP7 a une masse de 38 000 Da. Elle est très conservée entre les différents sérotypes. VP7 réagit avec les anticorps produits contre d'autres sérotypes, et à un moindre degré, avec les anticorps anti-EHDV-1 et anti-AHSV 4. En effet, les protéines VP7 d'autres *Orbivirus* tels que EHDV-1 et AHSV 4, sont intimement liées à celle du BTV. Comme nous allons le voir ultérieurement (III. C. 1.) VP7 est l'antigène spécifique de groupe du BTV (*Gumm et al.*, 1982 - 27).

#### *b. Les deux protéines de la capsid externe (figure 9)*

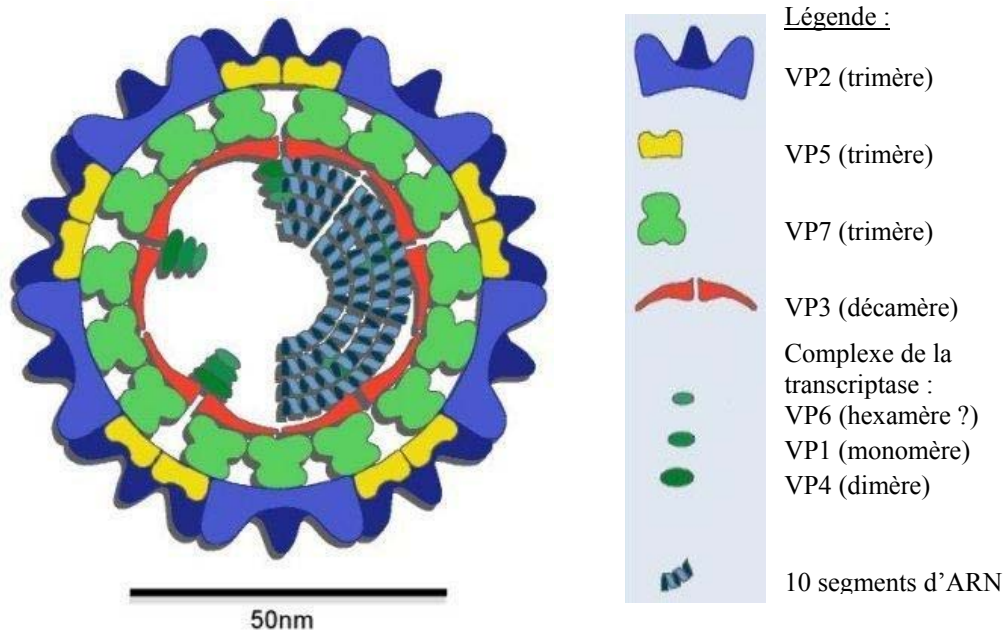
Le core icosaédrique est entouré par la capsid externe qui n'a pas de forme bien définie. Elle est composée de deux protéines : VP2 et VP5. La perte d'un de ces deux polypeptides conduit à la perte du pouvoir infectieux du BTV (*Spence et al.*, 1984 - 28).

**VP2** est une hémagglutinine qui est directement impliquée dans la fixation du virus aux cellules des mammifères. Lorsque VP2 est enlevée, l'hémagglutination, l'infectivité et la formation de particules dérivées est très nettement réduite chez les vertébrés. Elle est le produit du segment L2 du génome, qui présente la plus grande variation de séquence et de taille entre les sérotypes. Comme nous allons le voir ultérieurement (III. C. 1.), VP2 est



l'antigène spécifique de sérotype du BTV. A l'heure actuelle, 24 protéines différentes qui définissent chacune un sérotype ont été décrites. Très récemment, un virus nouvellement identifié chez la chèvre, le *Toggenburg virus* [TOV] est proposé comme étant le 25<sup>ème</sup> sérotype du BTV.

**VP5** présente également une très grande variation de taille entre les sérotypes. Il ne semble pas qu'elle joue un rôle quelconque dans la synthèse des anticorps neutralisants et sa contribution à la spécificité du sérotype n'a jamais pu être mise en évidence par précipitation des immuns complexes (Huisman *et al.*, 1981 - 29). Néanmoins, elle est très probablement impliquée dans la stimulation de la réponse immunitaire de façon indirecte, en modifiant la conformation de VP2 avec laquelle elle interagit. Les épitopes de VP2 étant dépendants de la conformation, VP5 intervient donc dans l'immunogénicité de VP2 en interagissant avec elle. Il est possible qu'elle joue également un rôle dans le développement de l'immunité cellulaire.



**Figure 9 : Organisation des protéines du BTV**

<http://www.fao.org/AG/aga/AGAH/EMPRES/GEMP/avis/A090-bt/tools/0-diag-BTV-core-organisation.html>  
Page consultée le 10 mai 2008

*c. Les protéines non structurales (Huismans et al., 1981 - 29)*

Les deux protéines non structurales majeures sont NS1 et NS2. Elles sont synthétisées abondamment, alors que les deux protéines mineures, NS3 et NS3A, sont assez difficiles à détecter. Les séquences de chacune des protéines non structurales sont très conservées entre les sérotypes du BTV. La synthèse de NS1 et de NS2 coïncide avec la synthèse de structures spécifiques du virus, les tubules et les corps d'inclusion viraux (viral inclusion bodies ou VIB), qui sont granulaires et dont la présence est caractéristique dans le cytoplasme des cellules infectées par les *Orbivirus*.

**NS1** compose les tubules qui sont des formes multimériques de NS1. Il s'agit de la protéine du BTV la plus synthétisée.

**NS2** est la seule protéine du virus qui est phosphorylée dans les cellules infectées. Elle participe à la synthèse de l'ARN simple brin.

**NS3** et **NS3A** sont des protéines très proches, qui appartiennent à la membrane glycoprotéique. Elles ont impliquées dans les derniers stades de la morphogenèse du BTV, dans son transport et sa sortie à l'extérieur des cellules infectées.

## **C. La réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par le BTV**

### **1. La protection conférée par les anticorps**

Les anticorps permettent la prévention ou la guérison grâce à la neutralisation du virus extracellulaire, et/ou du fait de l'interaction avec le complément et les déterminants antigéniques, en permettant la lyse des cellules infectées.

Chez un mouton infecté par le BTV, l'apparition des anticorps précipitant VP7 correspond à celle des anticorps fixant le complément. Ceci suggère que la spécificité de groupe du BTV, évaluée par la réaction de fixation du complément, est déterminée par VP7. Ces résultats sont confirmés par l'observation suivante : un liquide ascitique de souris contenant un titre élevé d'anticorps fixant le complément spécifiques du BTV, et un titre très faible d'anticorps neutralisants, contient presque exclusivement des anticorps qui précipitent VP7 (Huismans *et al.*, 1981 - 29). Ainsi, VP7, possède des déterminants antigéniques spécifiques de groupe. **VP7 est l'antigène de groupe** du BTV comme le confirme une étude de Gumm (Gumm *et al.*, 1982 - 27).

VP2 quant à elle provoque la production d'anticorps neutralisants, spécifiques de sérotype, qui semblent conférer une protection contre l'infection par un sérotype homologue chez un hôte vertébré. Il a été prouvé que, chez le mouton infecté par le BTV, la quantité d'anticorps précipitant VP2 dans le sérum est très corrélée aux titres d'anticorps neutralisants (Huismans *et al.*, 1981 - 29). L'analyse des précipités d'immuns complexes constitués de polypeptides solubles du BTV conjugués au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ), en présence de sérum de lapin et de cobaye hyperimmun a indiqué que VP2 est précipité uniquement par les sera de BTV homologues (Verwoerd *et al.*, 1972 - 25). Ceci indique donc que VP2 est le **déterminant principal de la spécificité de sérotype**.

VP7 est donc l'antigène de groupe alors que VP2 possède les déterminants antigéniques spécifiques du sérotype. Les anticorps monoclonaux spécifiques de VP2 neutralisent l'infection et semblent assurer une protection passive contre l'infection par un sérotype homologue. Le rôle de VP7 dans le développement de la réponse immunitaire reste encore à découvrir, mais étant donné que VP7 détermine la spécificité de groupe on présume qu'elle doit jouer un rôle important dans la mise en place de la réponse hétérotypique.

En ce qui concerne les animaux infectés *in utero*, certains semblent être immunotolérants et restent donc virémiques. Ainsi, le virus a été isolé chez des animaux qui ne possédaient pas d'anticorps détectables. En effet les agneaux dont les mères ont été en contact avec le virus n'ont pas de signes cliniques, et restent virémiques pendant plusieurs semaines après la naissance (Jeggo *et al.*, 1984 - 30). Certains facteurs permettent d'expliquer ce phénomène :

- La multiplication du virus dans les cellules du système réticulo-endothélial est très forte alors que les agneaux ont un système immunitaire encore immature et les anticorps ne préviennent pas la virémie.
- L'absorption sélective à travers l'intestin ne permet peut être pas le passage des anticorps associés à la protection ou à la neutralisation, dans le sang.
- Les anticorps ont peut-être une durée de vie courte : dans le cas de l'étude de Jeggo de 1984, les brebis avaient été infectées deux ans auparavant (Jeggo *et al.*, 1984 - 30).

Ainsi, les anticorps jouent un rôle important dans la protection contre la FCO mais il semble que la protection clinique des animaux dépend de l'interaction de plusieurs facteurs.

## 2. L'immunité à médiation cellulaire

Dans une étude de 1985 Stott et son équipe ont mis en évidence une réponse lymphocytaire spécifique d'antigènes du BTV qui est associée à la protection des animaux (Stott *et al.*, 1985 - 31).

Les LT, spécifiques d'antigènes du BTV, ont des propriétés cytotoxiques sur des fibroblastes autologues infectés par le virus. Etant donné que cette cytotoxicité est dirigée contre des cellules de la peau autologues qui étaient infectées par le BTV, les auteurs ont conclu que ces cellules n'étaient ni des cellules NK (natural killer), ni des cellules LAK (lymphokine-activated killer) (Takamatsu *et al.*, 1989 - 32). En outre, si les LT CD8 sont éliminés, l'activité cytotoxique disparaît. Il semble donc que ce sont les LTc qui sont responsables de la lyse des cellules. Ainsi, la lyse des cellules infectées est due à la reconnaissance d'épitopes du BTV associés à des molécules du CMH I par les LT CD8 (Andrew *et al.*, 1995 - 33).

En outre, certains sérotypes sont plus aptes à induire une réponse cytotoxique (Jeggo *et al.*, 1982 - 34).

Le transfert de LT totaux entraîne l'apparition plus précoce d'anticorps neutralisants. Les LT auxiliaires (LT helper ou LTh) spécifiques ont accéléré le développement de la réponse anticorps du receveur, entraînant ainsi la formation plus précoce et plus intense des anticorps. Il semble que le niveau de la réponse LT et lymphocytes B (LB) contre BTV, est régulée par les LTh et les cellules suppressives (Jeggo *et al.*, 1982 - 35).

Par ailleurs, il existe une réponse cellulaire mémoire mettant en jeu des LTc (Jeggo *et al.*, 1982 - 35). Après de multiples immunisations, les LTc mémoire ont été détectés dans le sang pendant 66 jours au moins ; de même des LTc mémoire, à l'inverse des cellules effectrices sont présents dans la lymphe efférente pendant un mois après la première immunisation. Ainsi, les LTc mémoire circulent pendant un certain temps, ils sont probablement capables d'être activés lors de réinfection et d'éliminer rapidement le virus (Andrew *et al.*, 1995 - 33).

Le transfert de lymphocytes isolés à partir du conduit thoracique d'un mouton immunisé contre BTV 3, à son jumeau homozygote protège partiellement ce dernier vis-à-vis d'un challenge homologue et hétérologue. Ainsi, l'inoculation du BTV 3 active une population de LT qui, collectés 14 jours après l'inoculation, sont capables après transfert à un individu syngénique, de diminuer la fièvre et la virémie chez ce dernier. Les lymphocytes assurent donc une part importante de la protection. Ceci n'est pas observé avec des LT collectés plus précocement, soit sept jours après infection (Jeggo *et al.*, 1984 - 34).

En outre dans cette étude Jeggo et son équipe ont montré que le transfert de LT assure une protection partielle lors de challenge hétérologue, suggérant que la réponse cellulaire joue un rôle important dans la réponse hétérotypique (Jeggo *et al.*, 1984 - 34).

### 3. La réponse immunitaire hétérotypique

La production d'anticorps neutralisants et d'anticorps fixant le complément est plus grande lorsque les moutons sont infectés avec le même sérotype que celui avec lequel ils ont été immunisés (Stott *et al.*, 1985 - 31).

Suite à l'immunisation de moutons à l'aide d'un BTV 4, on observe une bonne protection clinique et virologique, associée à la production d'anticorps spécifiques de groupe et d'anticorps neutralisants spécifiques de sérotype, lors d'une épreuve virulente avec un virus homologue. Un challenge hétérologue avec un BTV 3 entraîne l'apparition de signes cliniques, et d'une virémie (Jeggo *et al.*, 1986 - 36).

Quels sont les mécanismes de la réponse immunitaire hétérotypique ? Elle peut être due à des anticorps neutralisants ou aux LTc. Jeggo et son équipe ont montré en 1986 que le transfert de l'immunité passive via le sérum ne confère pas de protection lors de challenge hétérologue (Jeggo *et al.*, 1986 - 36). La composante humorale de la réponse immunitaire ne semble pas avoir de rôle dans la protection croisée entre les sérotypes. Jeggo avait suggéré en 1984 la possibilité d'une synergie entre les anticorps et les LTc (Jeggo *et al.*, 1984 - 34). Or, en 1986, Jeggo et Wardley ont constaté, grâce à de nouvelles expériences, qu'aucune amélioration de la protection n'est observée chez des animaux qui reçoivent des anticorps, en plus des LTc spécifiques du BTV (Jeggo *et al.*, 1986 - 36). La protection hétérotypique semble plutôt assurée par l'immunité cellulaire.

L'implication des LT dans la réponse immunitaire hétérotypique a été décrite pour les *Flavivirus* (Gajdowa *et al.*, 1980 - 37) , le FLUAV (Effros *et al.*, 1977 - 38) et pour le *Vesicular stomatitis Indiana virus* [VSIV] (virus de la stomatite vésiculeuse de sérotype Indiana) (Rosenthal *et al.*, 1980 - 39). La reconnaissance du BTV par les LTc n'est pas spécifique du sérotype à la différence de la réponse humorale. Des équipes ont mis en évidence l'existence d'une réaction croisée associée aux LTc chez des souris infectées par le BTV (Jeggo *et al.*, 1982 - 35) et lors de tests *in vitro* (Takamatsu *et al.*, 1989 - 32).

Comme décrit précédemment, le transfert des lymphocytes isolés du conduit thoracique entre jumeaux homozygotes apporte une protection partielle lors de challenge hétérologue alors que les anticorps qui sont détectés ne sont pas neutralisants (Jeggo *et al.*, 1984 - 34). Le transfert de LT issus d'un animal immunisé contre un sérotype confère donc un certain degré de protection vis-à-vis d'un sérotype différent.

Les LTc ne sont cependant pas capables seuls, d'assurer une réponse hétérotypique protectrice. On présume que les LTh sont indispensables dans cette réponse. En effet, des LTh impliqués dans la réponse hétérotypique, peuvent être présents parmi les cellules mémoires spécifiques du BTV et faciliter la réponse cytotoxique. Il est probable qu'ils augmentent la sensibilité des cellules infectées à l'action des LTc et qu'ils favorisent l'activité des NK (Jeggo *et al.*, 1984 - 34).

- Les LTc ne préviennent pas à eux seuls l'infection virale mais jouent vraisemblablement un rôle dans l'élimination du virus et sont compétents lors de réponse hétérotypique (Takamatsu *et al.*, 1989 - 32). Ainsi, l'idéal serait d'élaborer un vaccin qui induise à la fois une réponse humorale et une réponse cytotoxique pour obtenir une protection efficace et de longue durée.

## **D. La vaccination contre la FCO**

Il est une règle générale, rarement démentie par les essais, qui considère que l'immunité induite par la vaccination n'est généralement pas supérieure à celle présente chez un animal qui a guéri après une infection naturelle.

Les objectifs de la vaccination des animaux, et donc les performances des vaccins qui sont développés en conséquence sont assez variables en fonction de la nature des maladies visées. Ainsi, la vaccination est de loin la méthode de lutte la plus efficace contre les maladies

infectieuses aiguës qui bénéficient d'une réponse immune post-infectieuse stérilisante (Eloit, 1998 - 1).

Trois types de vaccins ont été envisagés contre la FCO : les vaccins vivants atténués, les vaccins inactivés et les vaccins recombinants. Seules les deux premières catégories de vaccins sont actuellement utilisées dans le cadre de la vaccination contre le BTV.

## 1. Les vaccins vivants atténués

La fabrication de ces vaccins consiste à sélectionner des virus capables de se développer *in vitro* mais dont la capacité à se répliquer chez l'hôte est très diminuée; ils ont perdu leur capacité à provoquer la maladie chez le mouton, suite à de nombreux passages sur culture cellulaire ou sur œufs embryonnés de poules. Ces vaccins ont fait par le passé la preuve de leur efficacité, en permettant de contrôler des épidémies associées à une forme clinique de la maladie en zone endémique.

C'est l'exemple de l'Afrique du sud où coexistent 21 sérotypes. Un vaccin monotypique a été produit et utilisé pendant à peu près 40 ans, puis il a été abandonné à cause des problèmes d'efficacité et de sécurité qu'il présentait.

Ensuite, des souches atténuées, plus sûres et plus efficaces ont été développées par passage sur œufs embryonnés. En réponse à l'épidémie de BTV 2 dans certains pays méditerranéens entre 1999 et 2000, un vaccin monovalent a été produit contre ce sérotype qui a conféré 99,7 % de protection clinique, sans qu'aucune virémie n'ait été détectée chez les animaux vaccinés (Hunter *et al.*, 2001 - 40).

Ces vaccins présentent donc l'avantage d'offrir une bonne protection face au virus sauvage homologue. De plus, ils sont faciles à produire et leur coût est faible puisqu'il faut un faible nombre de particules virales par dose et qu'une seule dose est suffisante pour protéger les animaux pour au moins une année (Murray *et al.*, 1996 - 41).

Cependant, ils présentent des inconvénients majeurs. Tout d'abord, il s'agit de vaccins qui sont spécifiques d'un seul sérotype, alors que, dans plusieurs pays, comme la France, plusieurs sérotypes sont présents ; cela implique une vaccination contre chacun d'entre eux.

Par ailleurs, les souches atténuées sont plus souvent neutralisées par l'immunité colostrale que les virus inactivés ou recombinants. Ils ont donc peu d'intérêt pour la vaccination des agneaux (Roy *et al.*, 1992 - 42).

Certains vaccins atténués contre la FCO provoquent des réactions post-vaccinales. Certains sont tératogènes et peuvent provoquer anœtrus et avortement, ce qui limite leur utilisation chez les brebis gestantes.

Suite à la vaccination, en même temps que la virémie, la présence de virus atténué est détectable dans la semence des taureaux et des béliers, ce qui interfère avec l'exportation de la semence des reproducteurs vaccinés vers des pays indemnes.

En outre, les souches vaccinales sont présentes dans le sang et les tissus périphériques à des titres suffisamment élevés pour que le virus atténué soit transmis par le vecteur arthropode ; cette remarque est à nuancer en fonction des vaccins. Certains auteurs attestent que la transmission par le vecteur ne peut pas se produire lorsque la virémie est inférieure à  $10^3$  ufp, ce qui est généralement le cas après vaccination avec les vaccins atténués récemment élaborés.

Une atténuation insuffisante ou la réversion de la virulence des virus atténués est également possible avec ce type de vaccins. Ainsi, suite à la campagne de vaccination contre le sérotype 16 en Italie en 2004, des moutons vaccinés et non vaccinés ont été malades à la suite de l'infection impliquant le virus atténué de la préparation vaccinale. Cet incident a été attribué à une mauvaise atténuation du virus vaccinal (Savini *et al.*, 2007 - 43).

Le réassortiment du virus atténué avec un virus sauvage, indépendamment du sérotype, peut se produire et entraîner l'apparition d'un virus avec un génome inédit et de nouvelles propriétés biologiques.

Lorsque des vaccins multivalents sont utilisés, des interférences entre les sérotypes sont possibles et concourent au développement d'une immunité incomplète (Roy *et al.*, 1990 - 44). En effet, en Afrique du Sud, les moutons sont vaccinés annuellement avec un vaccin multivalent à virus vivants atténués ; cependant, ils ne développent pas une immunité complète contre les différents sérotypes à cause de ces interférences.

Enfin, il n'est pas possible de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés, avec de tels vaccins.

- Pour contrôler la FCO, il est nécessaire de trouver des vaccins qui soient totalement sûrs et efficaces, produits à des prix abordables et en quantité suffisante (Hunter *et al.*, 2001 - 40). Les vaccins atténués, en particulier les vaccins polyvalents, ne remplissent pas les conditions d'innocuité et d'efficacité, nécessaires.



## 2. Les vaccins inactivés

Il s'agit de vaccins constitués du BTV tué. Il existe différentes techniques d'inactivation du virus. Savini et son équipe ont développé un vaccin à partir du BTV 16 inactivé par le trishydroxyméthylaminométhane (Tris). Ce vaccin a permis l'obtention de bons résultats, puisque les animaux vaccinés ont développé des titres élevés en anticorps neutralisants, et ont résisté au challenge homologue (Savini *et al.*, 2007 - 43).

En outre, l'immunisation de moutons à l'aide de virus inactivé avec l'éthylènimine ne permet pas la production d'anticorps neutralisants. Il est possible que l'inactivation du virus altère les caractéristiques antigéniques de celui-ci en modifiant la protéine de capsid VP2, contre laquelle est dirigée l'essentiel de la réponse anticorps neutralisante ; il est également possible que la quantité d'antigènes contenue dans le vaccin inactivé soit trop faible pour stimuler la réponse. L'absence d'anticorps neutralisants permet alors de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés qui eux produisent des anticorps neutralisants.

De tels vaccins sont associés à une diminution de la durée de la virémie, et à une réduction du risque de dissémination virale par un vecteur arthropode, ainsi qu'une atténuation des signes cliniques lors de challenge homologue ou hétérologue. Les vaccins inactivés confèrent donc un certain degré de protection (Stott *et al.*, 1985 - 31).

Face aux récentes épizooties de FCO survenues en Europe, différents vaccins inactivés ont été produits et employés pour protéger le cheptel européen. En France, des vaccins inactivés spécifiques des sérotypes 1 et 8 ont été utilisés en même temps. La vaccination à l'aide de tels vaccins assure une protection clinique des ruminants et permet une réduction de la virémie dans la quasi-totalité des cas. Elle limite le risque d'infection des insectes vecteurs à partir des ruminants vaccinés (car le titre sanguin est inférieur au titre considéré infectant) et empêche potentiellement l'atteinte du fœtus. En outre, ces vaccins induisent une immunité protectrice spécifique humorale, et probablement cellulaire, même si cela n'a pas été montré. Le nombre de déclarations d'effets indésirables relatifs à l'utilisation de ces vaccins est très faible et n'implique aucune remise en cause du ratio bénéfice / risque de la vaccination. Enfin, l'administration simultanée de deux vaccins monovalents n'a soulevé aucun problème d'innocuité, ce qui est très intéressant dans le contexte épidémiologique actuel de la France (<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article371>, 2009 – 45).

En revanche, si ces vaccins possèdent une grande sécurité d'utilisation, ils comportent néanmoins certaines imperfections. Etant donné que le virus n'est plus répliatif, la

stimulation antigénique est due à la quantité d'antigènes viraux présents dans le vaccin, et obligatoirement à la présence d'un adjuvant. Ainsi, le coût de production de ces vaccins est plus élevé que celui des vaccins atténués. De plus, il convient de répéter les injections vaccinales, ce qui augmente significativement le coût final de la vaccination.

Les essais réalisés jusqu'à aujourd'hui ont mis en évidence des réponses très différentes en fonction des individus, ce qui limite l'utilisation généralisée de ce vaccin (Murray *et al.*, 1996 - 41).

Enfin, ils sont responsables d'une sensibilisation de l'animal chez qui une réponse fébrile, à la suite de l'immunisation et du challenge, peut apparaître. Ainsi, les vaccins recombinants sont très intéressants car ils peuvent eux aussi conférer une immunité protectrice, sans entraîner le désagrément de la sensibilisation.

### 3. Les vaccins recombinants

C'est une approche vaccinale qui ne retient qu'une ou quelques rares fractions immunogènes de l'agent pathogène, qui ont préalablement été identifiées comme majeures. Habituellement, les composants immunogènes majeurs correspondent à des (glyco) protéines de structure. Il s'agit dans le cas du BTV des protéines du core (core-like particle ou CLP) ou de la capside externe (virus-like particle ou VLP). Certaines protéines non structurales, exprimées précocement au cours du cycle, peuvent également être de bons immunogènes.

Les vaccins recombinants sont souvent instables ; ils peuvent donc être facilement contaminés par le virus sauvage s'ils ne sont pas purifiés.

Il est difficile de prévoir la réponse immunitaire qu'un vaccin recombinant va induire chez l'individu vacciné pour plusieurs raisons :

- Le génome sélectionné pendant la purification du virus recombinant peut être différent de celui du virus original.
- L'activité transcriptionnelle du gène inséré peut varier à cause de séquences flanquantes différentes.
- Le degré de transcription du gène inséré peut être variable (Andrew *et al.*, 1995 - 33).

Par ailleurs, leur diffusion commerciale semble difficile dans le sens où les techniques de laboratoire mises en œuvre pour leur fabrication sont complexes.

Ces vaccins présentent cependant des avantages certains qui engagent à poursuivre la recherche pour leur application à la vaccination contre la FCO. En effet, ils ne se répliquent pas chez l'hôte. Ils ne contiennent que des constituants du virus et non pas le virus entier, ce qui élimine les risques de réversion ou de réassortiment, et leur confère une innocuité véritable, par comparaison aux vaccins atténués actuellement utilisés.

Les vaccins recombinants sont en outre des candidats parfaits pour la fabrication de vaccins qui permettent de différencier les animaux infectés de ceux qui ont été vaccinés. En effet, avec ces vaccins, seuls certains gènes du BTV sont exprimés et les animaux vaccinés sont dépourvus d'anticorps dirigés contre les protéines virales qui ne sont pas exprimées par le vecteur recombinant, alors qu'ils sont détectables chez les animaux infectés (Perrin *et al.*, 2007 - 46). Dans le cas de la FCO, on distingue les vaccins recombinants contenant des VLP (VP2 et VP5) de ceux qui contiennent des CLP (VP3 et VP7) (Murray *et al.*, 1996 - 41).

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine VP2 porte la spécificité de sérotype et contient la majorité des déterminants liés à la neutralisation virale. VP5 peut influencer cette qualité en modifiant la conformation de VP2. Ainsi, l'élaboration de vaccins capables d'exprimer ces protéines essentielles a été tentée. Différents vecteurs, dans lesquels ont été incorporés les gènes codant pour VP2 et VP5, ont été utilisés.

Le VACV s'est révélé être un outil valable pour l'étude des protéines virales et de leurs rôles dans la réponse immunitaire. Il a été utilisé pour l'élaboration de vaccins recombinants qui ont été capables d'induire une réponse immunitaire protectrice avec une grande sécurité d'utilisation pour les animaux. Ainsi il est apparu comme un vecteur utile pour étudier l'efficacité d'un vaccin recombinant exprimant les VLP (VP2 et VP5, BTV 1). Les anticorps neutralisants sont présents en plus grande quantité avec un vaccin recombinant exprimant VP2 et VP5 simultanément par rapport aux vaccins recombinants exprimant isolément l'une ou l'autre de ces protéines (Lobato *et al.*, 1997 - 47).

La variation de la réponse dirigée contre VP2 ou VP5 illustre le bénéfice d'inclure les deux antigènes dans le vaccin. Ces résultats ont été confirmés par les expériences de Roy en 1990 et de Boone en 2007 (Roy *et al.*, 1990 - 44) et (Boone *et al.*, 2007 - 48). Dans ces expériences, les gènes des protéines VP2 et VP5 ont été intégrés respectivement dans un vecteur Baculovirus, et dans un vecteur CNPV qui est d'ores et déjà utilisé pour la préparation de vaccins qui ont apporté la preuve de leur efficacité. Ces études ont mis en évidence une bonne corrélation entre la présence d'anticorps neutralisants et l'absence de virémie ou la

présence d'une virémie de plus courte durée. Tous les moutons immunisés ont résisté au challenge homologue auquel ils ont été soumis. En sachant que la virémie est bien corrélée à l'intensité de l'infection, son absence est donc un bon indicateur de la protection (Roy *et al.*, 1990 - 44).

Ces résultats confirment donc que VP2 est déterminante pour l'induction d'une réponse neutralisante qui induit une protection, et la présence de VP5 semble influencer positivement l'action de VP2. On peut supposer qu'elle affecte la conformation de VP2 et par là même ses propriétés immunologiques.

Des essais ont été réalisés avec d'autres protéines du BTV, qui sont supposées jouer un rôle dans la mise en place de la réponse cellulaire. Comme on l'a vu précédemment, VP7 est un antigène majeur de groupe du BTV et pourrait à ce titre induire une réponse immunitaire protectrice hétérologue via un mécanisme cellulaire impliquant des LT, qui sont les principaux effecteurs de la réponse hétérotypique, comme nous l'avons vu précédemment.

Wade Evans et son équipe ont intégré dans un *Capripoxvirus* le gène codant pour la protéine VP7 (BTV 1). Les moutons immunisés avec ce vaccin n'ont pas produit d'anticorps neutralisants, mais ont résisté au challenge homologue, et hétérologue avec BTV 2. Ces résultats semblent montrer qu'une protéine virale autre que les VLP peut être associée à un effet protecteur (Wade Evans *et al.*, 1996 - 49).

Plus récemment l'équipe de Perrin a cherché à combiner les avantages des VLP et des CLP en immunisant des moutons simultanément avec des vecteurs *Capripoxvirus*-VP2, *Capripoxvirus*-VP7, *Capripoxvirus*-NS3 et *Capripoxvirus*-NS1. Suite à l'immunisation, une séroconversion a été observée contre VP2, VP7 et NS3 ainsi qu'une lymphoprolifération spécifique des antigènes du BTV. Néanmoins, suite au challenge homologue une protection partielle des moutons immunisés a été mise en évidence, ce qui ne correspond pas aux résultats de Wade-Evans qui a obtenu une protection clinique significative avec un recombinant *Capripoxvirus*-VP7 (Perrin *et al.*, 2007 - 46) et (Wade Evans *et al.*, 1996 - 49). La combinaison des VLP et des CLP dans le but d'immuniser les animaux contre le BTV n'est pas encore maîtrisée. Il est possible que l'expression de chaque protéine soit insuffisante lorsque plusieurs protéines doivent être coexprimées, ceci entraînant une stimulation inadéquate de la réponse immunitaire. Les protéines sont délivrées séparément dans l'étude de Perrin et non coexprimées dans un même vecteur ; ceci empêche peut être l'expression antigénique normale des protéines sous leur forme VLP ou CLP (Perrin *et al.*, 2007 - 46).

➤ Si les VLP ne permettent que la protection homologue (VP2 étant considérée comme la protéine spécifique du sérotype), les CLP, en outre, semblent ouvrir la voie à des vaccins conférant une protection homologue et hétérologue (Wade Evans *et al.*, 1996 - 49), car la protéine VP7 est spécifique de groupe (Murray *et al.*, 1996 - 41).



# **PARTIE II :** **ETUDE EXPERIMENTALE**





Dans la continuité des expériences évoquées dans le paragraphe précédent et visant à élaborer un vaccin recombinant intégrant une CLP du BTV qui conférerait une protection homologue et hétérologue contre la FCO, il nous est apparu judicieux d'explorer la piste de l'immunité hétérologue conférée par VP7.

En ce qui concerne le choix du vecteur, nous avons écarté le vecteur *Capripoxvirus*. En effet, si ce dernier est un bon vecteur pour développer des vaccins multivalents recombinants permettant la production d'antigènes appartenant à un autre pathogène qui partage la même distribution géographique que lui, il est impossible de l'utiliser comme vecteur en Europe qui est indemne de ce pathogène.

Ainsi, le gène codant pour la protéine VP7 (BTV 2) a été intégré dans le génome de la souche vaccinale SG33 du MYXV (*Leporipoxvirus*) qui est déjà endémique en Europe, a un spectre d'hôte très étroit, est non répliatif dans de nombreux types cellulaires *in vitro*, mais permet l'expression de protéines étrangères ; en outre, ce virus n'est pas zoonotique.

## **I. Matériel et méthode**

### **A. Construction du MYXV recombiné exprimant VP7 (BTV 2)**

#### 1. Construction et structure des plasmides de transfert

La stratégie expérimentale qui a été utilisée pour la fabrication du plasmide de transfert est la suivante :

- Le gène de VP7 est cloné entre BamH<sub>I</sub> et Xba<sub>I</sub> sous la dépendance du promoteur précoce-tardif p7.5 du VACV.
- On clone parallèlement les gènes M9L et M12L encadrant le site choisi pour l'insertion du transgène VP7.
- Après amplification par la polymérase (polymerase chain reaction ou PCR) du transgène et du promoteur p7.5, celui-ci est inséré entre les gènes M9L et M12L.
- Enfin, la cassette de sélection Eco gpt (E. coli xanthine-guanine phosphoribosyltransférase) a été insérée dans le plasmide ainsi obtenu.

## 2. Obtention et structure des virus recombinés

Le virus recombiné est obtenu par recombinaison homologue après infection de cellules rénales de lapin 13 (rabbit kidney 13 ou RK13) par la souche SG33 du MYXV et la transfection simultanée avec le plasmide de transfert, comme indiqué sur la figure 10.

Une étape de sélection est nécessaire afin d'identifier et de sélectionner les virus recombinés : on ajoute de l'acide mycophénolique (mycophenolic acid ou MPA) qui, en tant qu'inhibiteur du métabolisme des purines, bloque la réplication virale sauf si les virus expriment le gène *Eco*gpt. Xanthine et hypoxanthine sont également ajoutées au milieu de culture.

## 3. Contrôle de l'expression du transgène

Afin de vérifier l'expression du transgène, un marquage immunologique avec des anticorps anti-VP7 a été réalisé. Nous avons utilisé des anticorps anti-MYXV afin de vérifier que le virus est présent.

A l'issue de ces expériences, les virus recombinés obtenus correspondent au schéma de la figure 10.

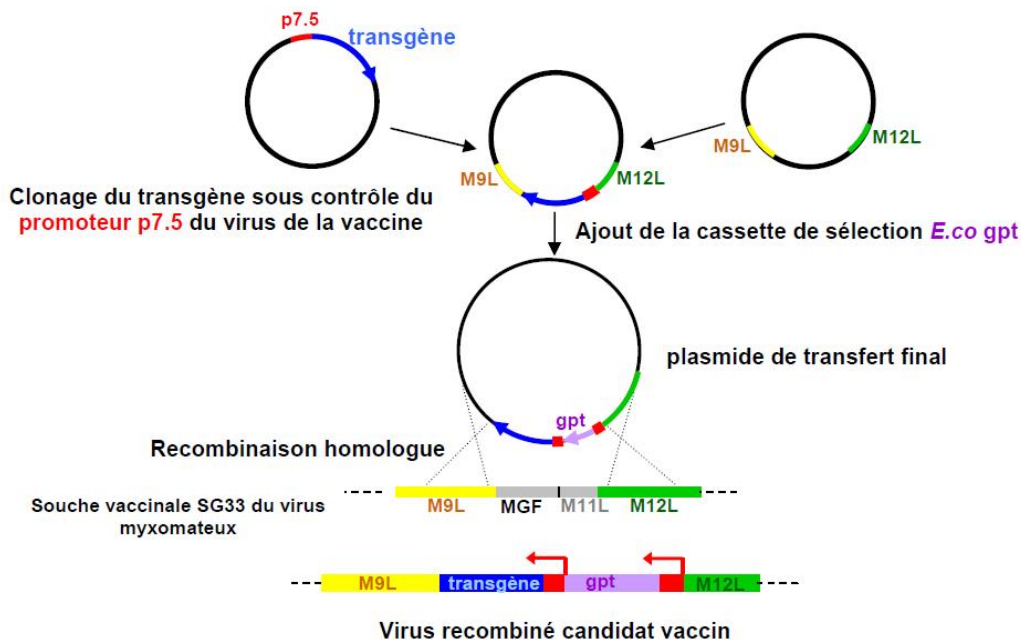


Figure 10 : Construction du virus recombiné SG33-VP7

## B. Immunisation des moutons : le protocole vaccinal

Les moutons, obtenus après croisement de brebis de race Lacaune et de béliers basco-béarnais, sont issus d'agnelages ayant eu lieu au sein de l'animalerie de l'unité mixte de recherche (UMR) 1225 Institut national de la recherche agronomique (INRA) / Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT) entre le 8 et le 15 janvier 2007, ils n'ont jamais quitté l'animalerie, ont été élevés dans les mêmes conditions et sont identifiés au niveau de l'oreille gauche. Les mères de ces animaux étaient indemnes de FCO. Les immunisations ont été réalisées au sein de l'animalerie de l'UMR 1225 INRA/ENVT interaction hôte/agent pathogène (IHAP).

Les 16 moutons inclus dans l'expérience ont été divisés en quatre groupes de quatre animaux :

- Groupe 1 : témoins non immunisés (deux mâles et deux femelles).
- Groupe 2 : ovins immunisés avec le vecteur SG33-VP7 ( $2.10^7$  ufp par mouton) par voie ID en un point (deux mâles et deux femelles).
- Groupe 3 : ovins immunisés avec le vecteur SG33-VP7 adjuvé avec le facteur de croissance pour granulocyte et macrophage (granulocyte macrophage-colony stimulating factor ou GM-CSF) (5 microgrammes ( $\mu\text{g}$ ) par mouton) par voie ID en un point (trois mâles et une femelle).
- Groupe 4 : ovins immunisés avec le vecteur SG33-VP7 adjuvé avec l'interféron  $\alpha$  ( $\text{IFN}\alpha$ ) (2  $\mu\text{g}$  par mouton) par voie ID en un point (deux mâles et deux femelles).

L'efficacité d'un vaccin dépend entre autre du profil cytokinique généré, puisque celui-ci détermine l'orientation de la réponse immune. Dès lors, la possibilité d'utiliser directement les cytokines comme adjuvants nous est apparue comme une perspective attractive (Vermout *et al.*, 2003 - 50). Nous avons ainsi choisi de combiner l'immunisation par le virus recombinant chez certains animaux avec l'injection d' $\text{IFN}\alpha$  ou de GM-CSF, dans le but d'amplifier l'expression du vecteur et par voie de conséquence la réponse induite comme expliqué à l'annexe 1.

Les animaux ont été immunisés à trois reprises à jour 0 (J0), J24 et J90, toujours selon le même protocole ; ils étaient âgés d'environ huit mois et demi lors de la première immunisation le 21 août 2007. La figure 11 présente le protocole expérimental selon lequel nous avons procédé.

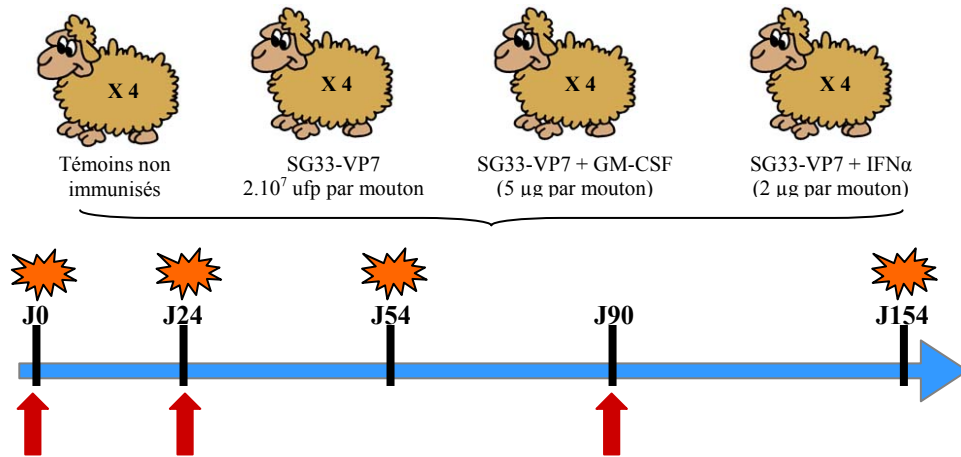





Figure 11 : Protocole expérimental

Légende :

-  Prélèvement sanguin
-  Immunisation
-  Prélèvements pour la sérologie

## C. Analyse de la réponse cellulaire

### 1. Test de prolifération lymphocytaire

Afin d'étudier la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nous avons procédé à une analyse de la prolifération cellulaire des cellules mononucléées (peripheral blood mononuclear cell ou PBMC) en cytométrie en flux, sur tous les moutons de l'étude selon le protocole décrit à l'annexe 2. Les échantillons de sang ont été prélevés sur tube acide éthylène diamine tétra acétique (ethylene diamine tetracetic acid ou EDTA) à J0, J24 et J90.

Après isolement des PBMC sur un gradient de Ficoll, les cellules ont été marquées avec le CFSE (carboxyfluorescéine succinimidyl ester) et mises en culture en plaques. La prolifération des LT CD4 a ainsi pu être étudiée en analysant la perte de fluorescence CFSE.

Le CFSE diffuse passivement dans les cellules, il est incolore et non fluorescent jusqu'à ce que les groupes acétates dont il est composé, soient clivés par les estérases intracellulaires pour produire un CFSE très fluorescent. Le groupe succinimidyl ester réagit avec les amines intracellulaires et forme des conjugués fluorescents qui sont très bien retenus

et qui peuvent être fixés avec un fixateur aldéhyde. Par la suite, le CFSE est partagé avec une grande fidélité entre les cellules filles et il est possible de détecter huit à dix générations de cellules *in vivo* et *in vitro*. Nous avons choisi cette méthode car elle permet de déterminer le nombre de générations qui ont été produites.

Des anticorps appropriés peuvent être utilisés pour sonder les changements des marqueurs de surface alors que les cellules se divisent ou des changements dans l'expression des molécules internes telles que les cytokines lorsque des protocoles adéquats de perméabilisation et de fixation sont utilisés (Lyons, 2000 - 58). Ainsi, les PBMC ont fait l'objet d'un double marquage avant d'être analysées par le cytomètre en flux selon quatre couleurs (CFSE, iodure de propidium ou IP, groupe de différenciation 2 (cluster of differentiation 2 ou CD2) et CD4) :

- Un marquage CD2 afin de cibler l'analyse sur les LT, acteurs majeurs de la réponse cellulaire.

- Un marquage CD4 afin de différencier les différents LT : les cellules CD4<sup>+</sup> correspondent aux LTh dont l'activation conduit à la synthèse de cytokines qui jouent un rôle dans l'activation et la prolifération des LB, des macrophages et des LTc. IL2 et IFN $\gamma$  activent notamment les LT CD8<sup>+</sup> qui correspondent aux LTc.

Les LT CD2<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> correspondent aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> et les LT CD2<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> correspondent aux lymphocytes CD8<sup>+</sup>.

La figure 12 présente le principe de l'infection-marquage des PBMC afin d'évaluer la capacité de SG33-VP7 à activer les LT CD4. Les PBMC marqués au CFSE ont été mis en culture dans un milieu simple ou complétement avec :

- Concanavaline A (ConA) qui est une lectine agissant sur le récepteur membranaire stimulant la prolifération non spécifique de l'activation lymphocytaire.

- SG33-VP7 afin d'évaluer la réponse cellulaire contre le vecteur associé au transgène VP7.

- VP7 afin de d'analyser plus précisément la réponse dirigée contre la protéine du BTV choisie dans notre projet.

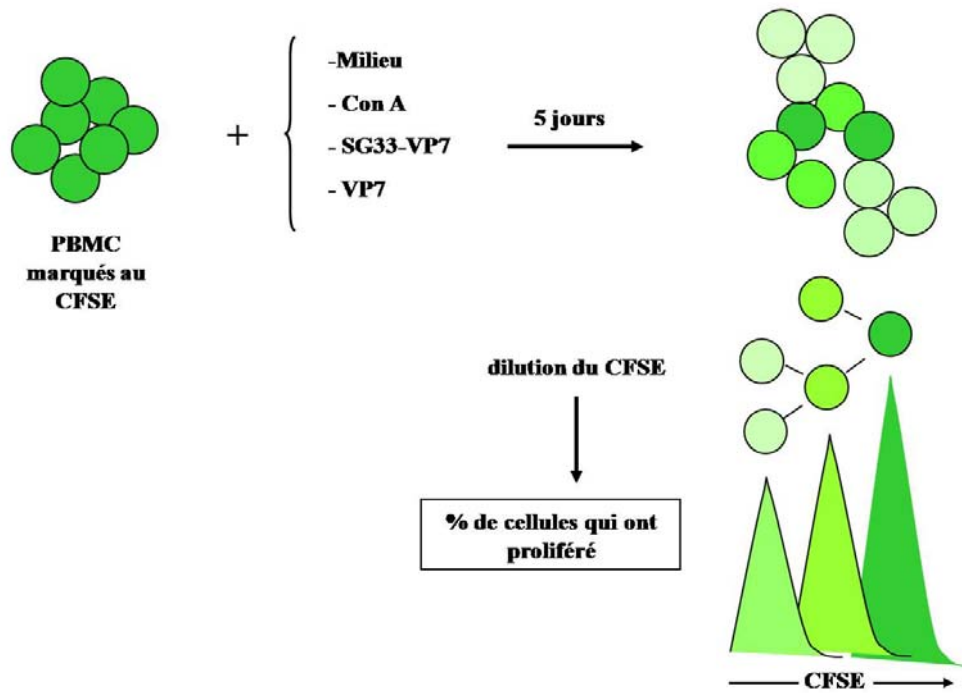


Figure 12 : Principe d'évaluation de la capacité du vecteur SG33-VP7 à activer les LT CD4

## 2. Détection des LT CD8

Les LT CD8 reconnaissent les peptides liés au CMH I. De nombreuses cellules de l'organisme expriment le CMH I. Dans le but de détecter l'activité des LT CD8 en réponse à l'immunisation nous avons utilisé une méthode qui repose sur la détection de l'IFN $\gamma$  intracellulaire dans les LT CD8, après stimulation avec le MYXV. Le protocole de la manipulation est décrit à l'annexe 3.

Après isolement des PBMC sur gradient de Ficoll, et stimulation des LT par infection avec le virus SG33, la monensine est ajoutée. Elle a la propriété de bloquer la sécrétion des protéines synthétisées dont l'IFN $\gamma$ , et permet ainsi la détection de la production d'IFN $\gamma$  qui s'accumule dans la cellule. Puis, les cellules sont divisées en deux groupes qui font chacun l'objet de marquages intra et extracellulaire. Enfin, la prolifération cellulaire est analysée par cytométrie en flux et la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les LT CD8 activés a ainsi pu être mise en évidence. Par extension, nous avons pu étudier la prolifération des LT CD8 en fonction du type d'immunisation reçue par les moutons.

## **D. Détection de la réponse humorale**

Dans le but de suivre l'évolution de la réponse anticorps suite à l'immunisation des moutons, nous avons réalisé un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) qui est un test de dosage immunoenzymatique, ainsi qu'un test de séroneutralisation.

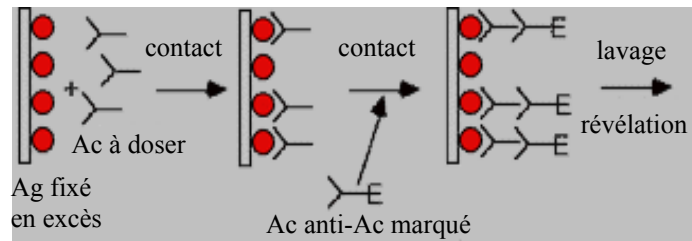
### **1. Test ELISA indirect**

Le sang est récolté sur tube sec et identifié par le numéro d'identification du mouton et par le jour de la prise de sang (le jour de la première immunisation correspond à J0). Les prélèvements ont été réalisés à J0, J24, J54, J90, J154. Le test ELISA indirect est réalisé selon le protocole de l'annexe 4.

Le vecteur SG33-VP7 ou la protéine VP7 sont déposés sur un support : les puits d'une plaque de microtitration. Les puits sont recouverts par les échantillons de sérum à tester et dont la concentration en anticorps anti-SG33-VP7 ou anti-VP7, selon le cas, est inconnue. Les anticorps à tester réagissent avec le vecteur ou la protéine déposé(e) sur le support. La plaque est ensuite lavée de façon à retirer les anticorps non liés et seuls les complexes vecteur-anticorps anti-SG33-VP7 ou protéine-anticorps anti-VP7 demeurent attachés à la surface des puits.

La quantité d'anticorps fixés à l'antigène est ensuite mesurée grâce à l'utilisation d'un deuxième anticorps : une anti-immunoglobuline (anti-Ig) de mouton couplée à une enzyme modificateur de substrat qui permet de suivre la réaction. Ces anticorps secondaires se lient à tout complexe antigène-anticorps. Un second rinçage de la plaque permet alors d'éliminer les anticorps secondaires non liés.

Puis le substrat de l'enzyme est ajouté et on évalue l'activité enzymatique, proportionnelle à la quantité d'anticorps que l'on cherche à titrer. Certains substrats spécifiques possèdent la propriété de donner des produits de réaction solubles colorés permettant un dosage précis par une mesure de la densité optique (DO). L'enzyme agit comme amplificateur : quand bien même peu d'anticorps conjugués à l'enzyme seraient attachés, l'enzyme catalyserait la formation de nombreux signaux, ce qui rend ce test très sensible, mais augmente également le nombre de faux positifs. Il faut donc, comme d'habitude, prévoir des puits "contrôles". Le principe du test ELISA indirect est repris figure 13.



**Figure 13 : Principe de l'ELISA indirect**

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>  
Page consultée le 15 septembre 2009

## 2. Séroneutralisation

Le principe de la séroneutralisation consiste à évaluer l'aptitude d'un sérum à bloquer la capacité infectante d'un inoculum. Cette aptitude peut être analysée par exemple en vérifiant la disparition de l'effet cytopathique (ECP) d'un virus en présence de dilutions croissantes du sérum à tester. Si cette inhibition est obtenue, on conclut à la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum testé. Dans notre cas, le but est de mettre en évidence la présence d'anticorps capables de neutraliser le vecteur vaccinal SG33 et surtout le BTV via des anticorps neutralisants qui reconnaîtraient le transgène VP7. Ainsi, deux séries d'essais ont été réalisées : la première mettait en contact les sérums des animaux immunisés avec le virus SG33 et la seconde évaluait l'effet de ces sérums sur le BTV 2. Les sérums à tester sont les sérums à J154 des 16 moutons de l'expérience. L'ECP se manifeste sous la forme de plages de lyse cellulaire. Le protocole expérimental utilisé pour le test de séroneutralisation est rapporté à l'annexe 5.



## E. Epreuve virulente

Un protocole expérimental a été mis en place à la plate forme d'infectiologie expérimentale (PFIE) de l'INRA de Tours, qui dispose d'animaleries de niveau de bioprotection A3, nécessaires à la manipulation du BTV lors du test d'efficacité du vaccin par épreuve virulente. Dix moutons ont été éprouvés avec la souche BTV 8 (W1B2, Allemagne, 2007) :

- Cinq moutons immunisés à l'ENVT selon le protocole évoqué précédemment (Partie II. I. B.) 10 mois auparavant. Ces animaux ont été sélectionnés parmi les meilleurs répondeurs : deux moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 non adjuvé, deux moutons immunisés avec le vecteur adjuvé avec GM-CSF et un mouton immunisé avec le vecteur adjuvé avec IFN $\alpha$ .

- Cinq moutons contrôles non immunisés.

A l'issue de l'expérimentation, les animaux ont été euthanasiés et incinérés (J22).

L'inoculation a été réalisée à l'aide d'une injection sous-cutanée de 10 millilitres (ml) de sang prélevé sur un mouton infecté au pic de la virémie (cycle-seuil ou cycle threshold ou Ct = 20,5 ; J6) et trois injections ID de milieu d'une culture de cellules infectées par la même souche (titre viral  $5.10^5$  ufp/ml).

### 1. Suivi clinique

A la suite de l'épreuve, un suivi clinique a été réalisé de J-1 à J17 (avec J0 le jour de l'épreuve virulente) afin de mesurer la sévérité des symptômes généraux et locaux liés à l'infection par BTV 8. L'examen clinique était effectué deux fois par jour, tous les jours. Le suivi clinique comprenait une mesure de la température et la notation des signes cliniques selon un système de score indiqué dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Tableau descriptif du « scoring » clinique**

<i>Signes cliniques</i>	<i>Présentation</i>	<i>Score</i>
<i>Jetage oculaire</i>	Absent	0 point
	Séromuqueux	1 point
	Purulent	2 points
<i>Jetage nasal</i>	Absent	0 point
	Séromuqueux	1 point
	Purulent	2 points
<i>Ptyalisme</i>	Absent	0 point
	Modéré	1 point
	Marqué	2 points
	Sévère	3 points
<i>Lésions cavité buccale</i>	Absentes	0 point
	Présentes	1 point
<i>Cyanose de la langue</i>	Absente	0 point
	Présente	1 point
<i>Lésions du mufle et du chanfrein</i>	Absentes	0 point
	Présentes	1 point
<i>Lésions podales (bourrelet coronaire)</i>	Absentes	0 point
	Présentes	1 point
<i>Diarrhée</i>	Absente	0 point
	Présente	1 point
<i>Toux</i>	Absente	0 point
	Présente	1 point
<i>Autres signes cliniques</i>		

## 2. Détection des anticorps anti-VP7 par ELISA de compétition

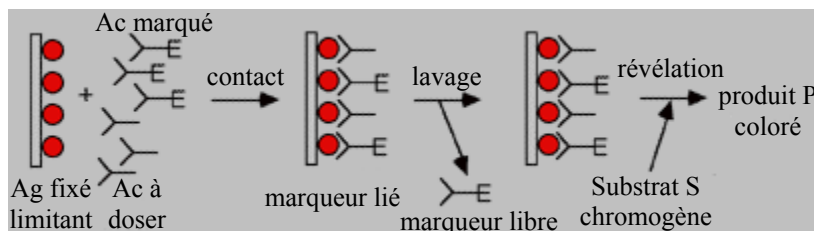
Des échantillons sanguins ont été prélevés tous les deux jours de J0 à J12, sur tubes secs.

Le test ELISA par compétition de liaison est un test sérologique destiné à la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la protéine VP7 du BTV. Il a été effectué à l'aide de l'ELISA par compétition de liaison ID Screen® Bluetongue Competition (ID-VET, Montpellier, France). Les étapes de réalisation du test sont décrites à l'annexe 6.

Les puits sont sensibilisés avec la protéine VP7. Les anticorps anti-VP7, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps qui masque les épitopes de la VP7. Un conjugué anti-VP7 marqué à la peroxydase (POD) est distribué dans les puits. Il se fixe sur les épitopes de la VP7 restés libres, formant un complexe antigène-conjugué-POD. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation tétraméthylbenzidine (TMB). La coloration qui en résulte est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester.

- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage de la réaction avec l'acide sulfurique.
- En présence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

Ainsi, plus grande est la teneur en anticorps de l'échantillon, plus faible est la quantité de conjugué anti-VP7 marqué qui sera capable de se lier aux antigènes du puits, d'où le terme de « compétition ». Donc, dans l'ELISA de compétition, plus haute est la concentration initiale de l'anticorps plus faible est le signal. Le principe du test ELISA par compétition de liaison est repris figure 14.



**Figure 14 : Principe de l'ELISA par compétition de liaison**

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>  
Page consultée le 15 septembre 2009

### 3. Mesure de la virémie par RT-PCR quantitative

La virémie a été mesurée quotidiennement de J0 à J8 sur l'ensemble des moutons soumis à l'épreuve virulente. Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur tube EDTA après ponction de la veine jugulaire.

La RT-PCR quantitative est une technique destinée à quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon.

La RT-PCR est une technique qui associe une transcription inverse (reverse transcriptase ou RT) suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse. Cet ADNc (ADN complémentaire ou simple brin artificiellement synthétisé à partir d'un ARNm), est généralement destiné à être amplifié par PCR.

La PCR quantitative permet de mesurer la quantité d'ARN viral dans le sang. Elle permet la mesure du nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorces) produits au cours de la réaction ; cette quantité est proportionnelle au nombre de copies présentes dans le tube au début de la réaction. On l'appelle aussi PCR en temps réel car elle permet de suivre la quantité d'ADN au fur et à mesure de leur accumulation.

Après extraction de l'ARN à l'aide du kit Macherey Nagel, Düren, Germany Nucleospin 8/96, la détection du BTV a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR quantitative sur le gène L1 du BTV avec le kit Taqvet all genotypes (LSI<sup>ND</sup>, Lissieu, France). La transcription inverse suivie d'une PCR a été réalisée en utilisant un système de PCR en temps réel (Applied Biosystem Life technologies Corporation, Carlsbad, USA). Les résultats ont été analysés avec le logiciel SDSsoftware v1.2. Le protocole expérimental est expliqué à l'annexe 7.

## **II. Résultats**

### **A. Réponse cellulaire**

#### 1. Test de lymphoprolifération

Afin de détecter la prolifération des lymphocytes suite à l'immunisation, nous avons procédé à une expérience d'infection-marquage des PBMC qui nous a permis d'étudier la réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire dirigée contre le virus recombiné SG33-VP7 et contre la protéine VP7.

Les PBMC ont été isolées à l'aide de la technique du gradient de Ficoll puis stimulées en présence de milieu, de ConA (activateur non spécifique des LT) ou du vecteur SG33-VP7. Après cinq jours de culture, la prolifération des PBMC a été évaluée à travers l'analyse de la dilution du CFSE à l'aide de la cytométrie en flux basée sur le principe suivant : la fluorescence des PBMC marquées avec du CFSE diminue de moitié à chaque division.

Comme le montre la figure 15, la lymphoprolifération observée correspond à l'activation de LT CD2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Il s'agit donc de l'activation des LT CD4 et non des LT CD8. Le nombre de ces derniers est proportionnellement beaucoup plus faible même si certaines cellules se sont divisées.

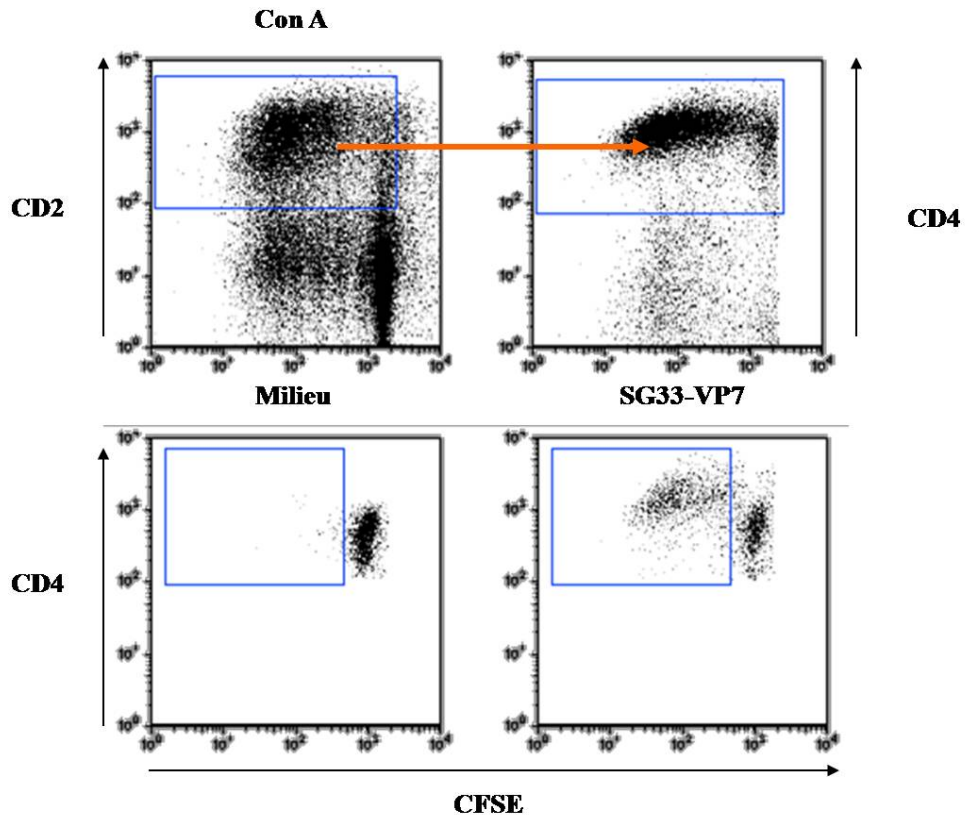


Figure15 : Résultat de la réponse cellulaire obtenue pour un des moutons immunisés avec SG33-VP7

Légende :

L'axe des abscisses représente la fluorescence verte due au CFSE.

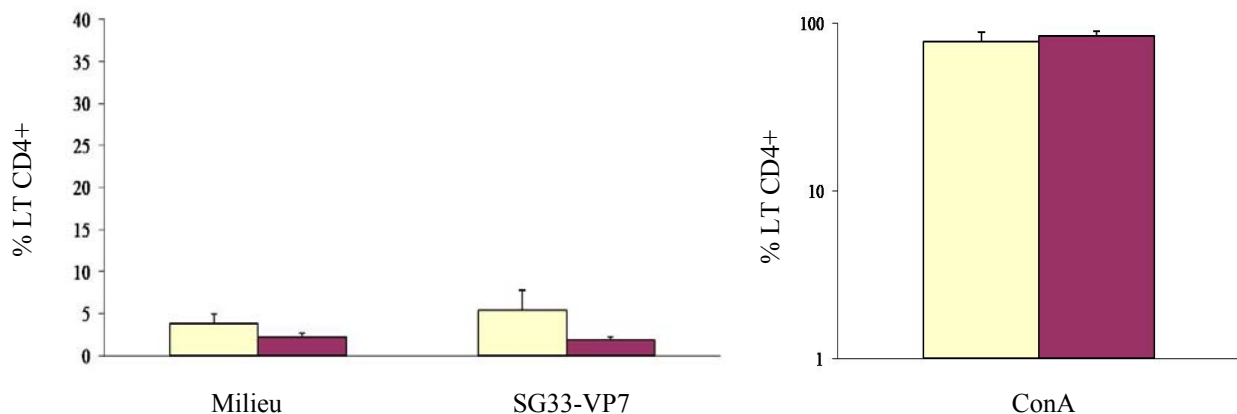
L'axe des ordonnées représente le marquage CD4 (rouge) et CD2.

Les cadrans supérieurs correspondent aux cellules CD2+/CD4+.

Les cadrans inférieurs correspondent aux cellules CD2+/CD4- soit aux cellules CD8+.

Sur les graphiques 1 et 2, on observe que la présence de ConA a provoqué une lymphoprolifération forte des LT CD4 ; celle-ci est très similaire entre les quatre groupes de moutons, quelle que soit l'immunisation. Ce contrôle indique que les capacités de réponse des cellules ainsi préparées sont proches les unes des autres. On constate également (notamment sur le graphique 2) que les PBMC en présence de milieu seul ont peu proliféré dans les quatre groupes de moutons. Ces deux tests permettent de valider la suite des résultats obtenus.

Sur le graphique 1, on observe une **activation des LT CD4 en présence de SG33-VP7**. D'après le test de Mann et Whitney, les séries avec des effectifs de quatre ovins, la différence d'activation des LT CD4 entre les moutons immunisés avec SG33-VP7 et les moutons non immunisés n'est pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5 \%$ . Mais l'activation des LT CD4 dans le groupe de moutons immunisé avec SG33-VP7 présente une forte tendance à être plus grande que celle observée dans le groupe de moutons non immunisés.

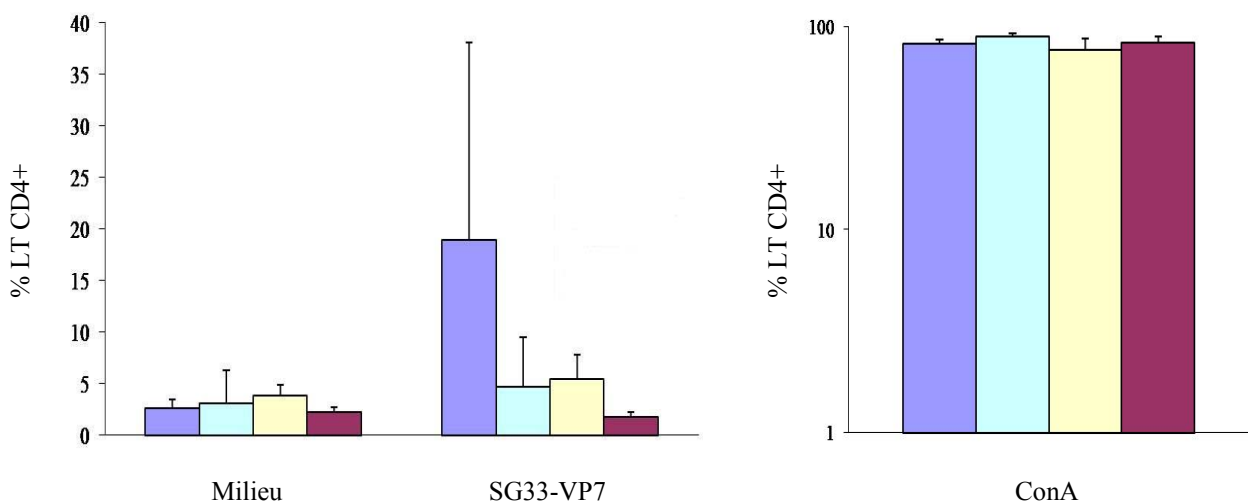


**Graphique 1 : Activation des LT CD4 (J90) des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7**

Légende :

- Moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7
- Moutons témoins non immunisés

Le graphique 2 qui montre l'activation des LT CD4 dans les quatre groupes de moutons présente comme le graphique 1 une activation des LT CD4 en présence de SG33-VP7. Les PBMC des moutons immunisés avec le vaccin adjuvé avec IFN $\alpha$  ont une activation quasi-similaire aux PBMC des moutons immunisés avec SG33-VP7 seul. **L'activation des LT CD4 est plus grande chez les moutons préalablement sensibilisés avec le SG33-VP7 adjuvé avec GM-CSF.** Cependant, il existe une **grande hétérogénéité de réponse** comme l'indique la valeur de l'écart type qui est très grande pour les moutons immunisés avec le vaccin adjuvé avec GM-CSF. Ces résultats ne permettent pas de conclure à un effet significatif de l'adjuvant GM-CSF ou IFN $\alpha$ . En effet, d'après le test de Mann et Whitney, les séries de quatre ovins, la différence d'activation des LT CD4 entre les moutons immunisés avec SG33-VP7 et les moutons immunisés avec SG33-VP7 adjuvé avec GM-CSF n'est pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5\%$ .



**Graphique 2 : Activation des LT CD4 (J90) de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience : effet des cytokines adjuvantes**

Légende :

- Moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 adjuvé avec GM-CSF
- Moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 adjuvé avec IFN $\alpha$
- Moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7
- Moutons témoins non immunisés



Nous avons également étudié la stimulation avec la protéine recombinante VP7 seule. Aucune activation n'a pu être mise en évidence (résultats non montrés). A ce stade, il n'est donc pas possible de conclure si la réponse vis-à-vis de la protéine VP7 est présente et s'il existe des différences entre les groupes.

## 2. Réponse lymphocytaire T CD8

La complémentation du milieu en ConA a mis en évidence une lymphoprolifération importante mais non spécifique de VP7 des LT CD8 dans les quatre groupes de moutons, quelle que soit le type d'immunisation. Par contre, aucune production d'IFN $\gamma$  n'a pu être détectée lors de la stimulation avec SG33-VP7. Ainsi, nous n'avons pas jugé utile de présenter les résultats.

## **B. Réponse humorale**

### 1. ELISA

Pour analyser la réponse anticorps spécifique du transgène VP7, des analyses sérologiques ont été réalisées régulièrement après la première injection vaccinale. L'objectif de cette expérience consiste à étudier la capacité du MYXV à induire une réponse immunitaire spécifique. L'intérêt de cette méthode sérologique est sa grande sensibilité permettant le dépistage de faibles taux d'anticorps.

#### *a. Cinétique de la réponse humorale contre le vecteur vaccinal et le transgène pour les moutons vaccinés avec SG33-VP7 non adjuvé*

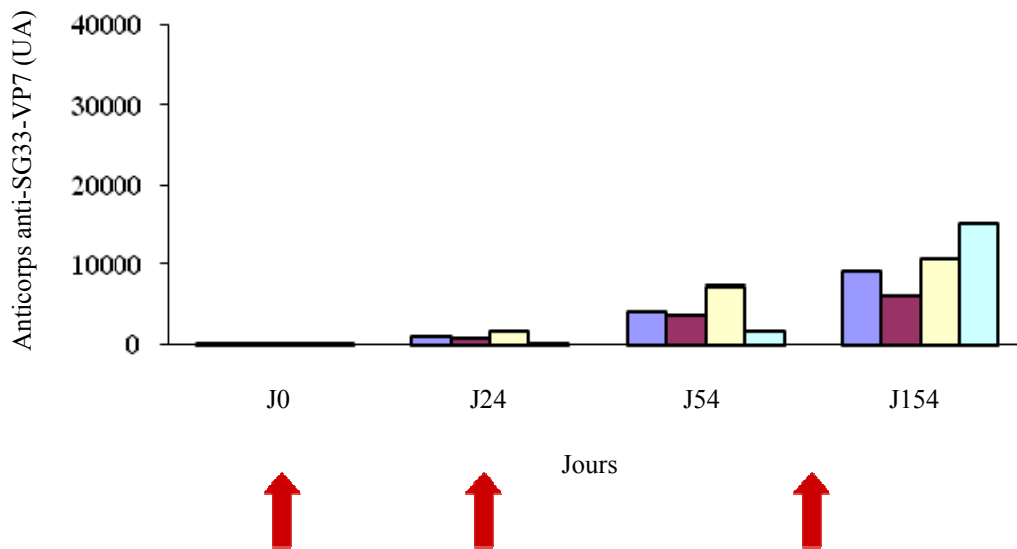
*In vivo*, lors d'une réponse immunitaire classique chez un animal naïf, à la suite d'une infection par exemple, les LT et les anticorps spécifiques sont généralement détectables 10 à 14 jours après la première immunisation. Les LTc mémoires se développent à partir de ces populations et persistent ensuite pendant des durées plus ou moins longues.

Sur le graphique 3 qui montre la réponse anticorps anti-SG33-VP7 des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 non adjuvé et le graphique 4 qui montre la réponse anticorps anti-VP7 des moutons immunisés avec SG33-VP7, aucune réponse n'est détectée à J24, alors que les moutons n'ont reçu qu'une seule injection de SG33-VP7. Une seule immunisation ne semble donc pas suffisante pour induire une réponse anticorps spécifique du vecteur et du transgène.

Par contre à J54 et J154, la réponse anticorps est supérieure au seuil de détection et présente chez tous les animaux. Les titres en anticorps observés à J154 sont légèrement supérieurs à ceux observés à J54.

Ainsi, on observe une augmentation du titre anticorps au cours du temps ; **la réponse est donc présente et mesurable à la suite de 2 injections**. Un rappel supplémentaire augmente encore légèrement cette réponse

D'après le test de Mann et Whitney, les groupes comportant quatre ovins, la différence entre la réponse anticorps des moutons à J24 et la réponse anticorps des moutons à J54 n'est pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5\%$ . Mais la réponse anticorps des moutons après deux immunisations présente une forte tendance à être plus élevée que celle observée après une seule immunisation.

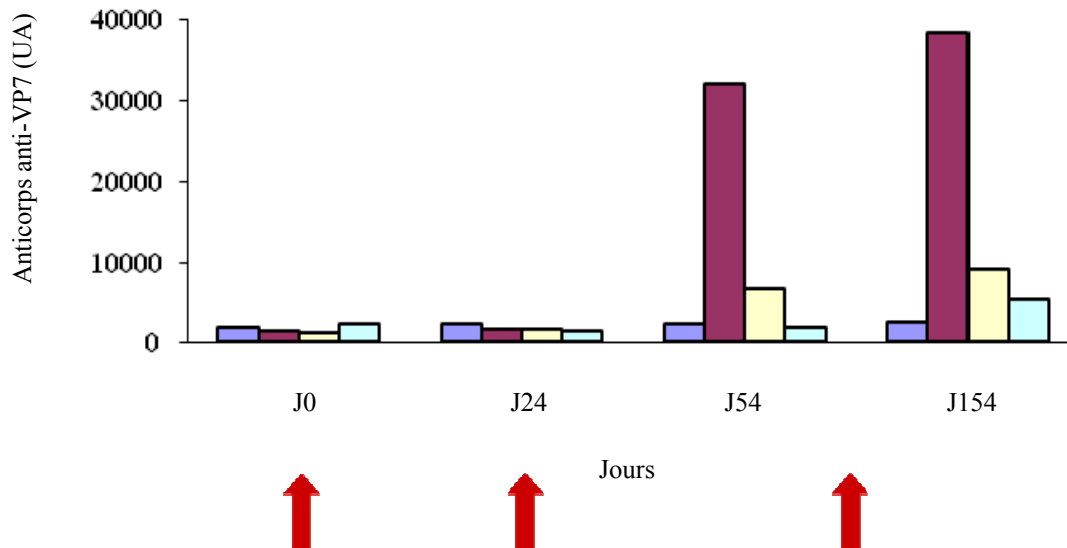


**Graphique 3 : Réponse anticorps anti-SG33-VP7 des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7**

Légende :

- Les flèches rouges représentent les trois immunisations à J0, J24 et J90.
  - Les moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 sont numérotés arbitrairement de 1 à 4.
- 1
  - 2
  - 3
  - 4

Le graphique 4 montre que l'on peut observer une réponse humorale contre le transgène seul, celle-ci est néanmoins très hétérogène.



**Graphique 4 : Réponse anticorps anti-VP7 des moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7**

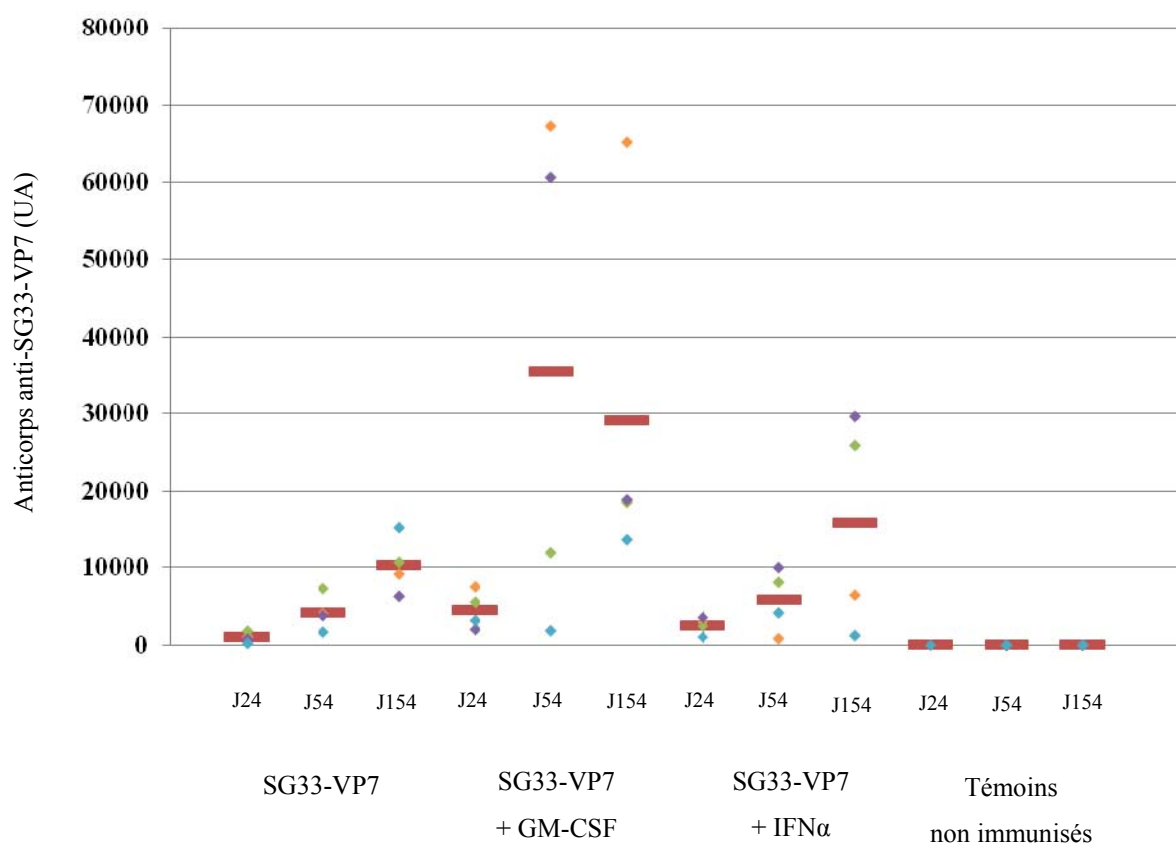
Légende :

- Les flèches rouges représentent les trois immunisations à J0, J24 et J90.
  - Les moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 sont numérotés arbitrairement de 1 à 4.
- |   |   |
|---|---|
| ■ | 1 |
| ■ | 2 |
| ■ | 3 |
| ■ | 4 |

### *b. Effet des cytokines adjuvantes*

Le graphique 5, présente la réponse anticorps anti-SG33-VP7 de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience à J24, J54 et J154. La réponse est très bonne pour les moutons immunisés avec SG33-VP7 adjuvé avec GM-CSF et plus modeste pour ceux immunisés avec le vecteur adjuvé avec IFN $\alpha$ . Ces résultats sont interprétables puisqu'on n'observe pas de réponse anticorps chez les animaux témoins (non immunisés). Cependant, il existe une **grande hétérogénéité de réponse comme l'indique la valeur de l'écart type qui est très grande pour les moutons immunisés avec le vaccin adjuvé avec GM-CSF**. Ces résultats ne permettent pas de conclure à un effet significatif de l'adjuvant GM-CSF ou IFN $\alpha$ .

D'après le test de Mann et Whitney, pour des séries comportant des effectifs de quatre ovins, la différence entre la réponse anticorps des moutons immunisés avec SG33-VP7 et la réponse anticorps des moutons immunisés avec le vecteur adjuvé avec GM-CSF n'est pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5\%$ . Mais la réponse anticorps des moutons immunisés avec GM-CSF présente une forte tendance à être plus grande que celle observée après une immunisation avec le vecteur non adjuvé. De plus, la différence entre la réponse anticorps des moutons immunisés avec SG33-VP7 et la réponse anticorps des moutons non immunisés n'est également pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5\%$ .



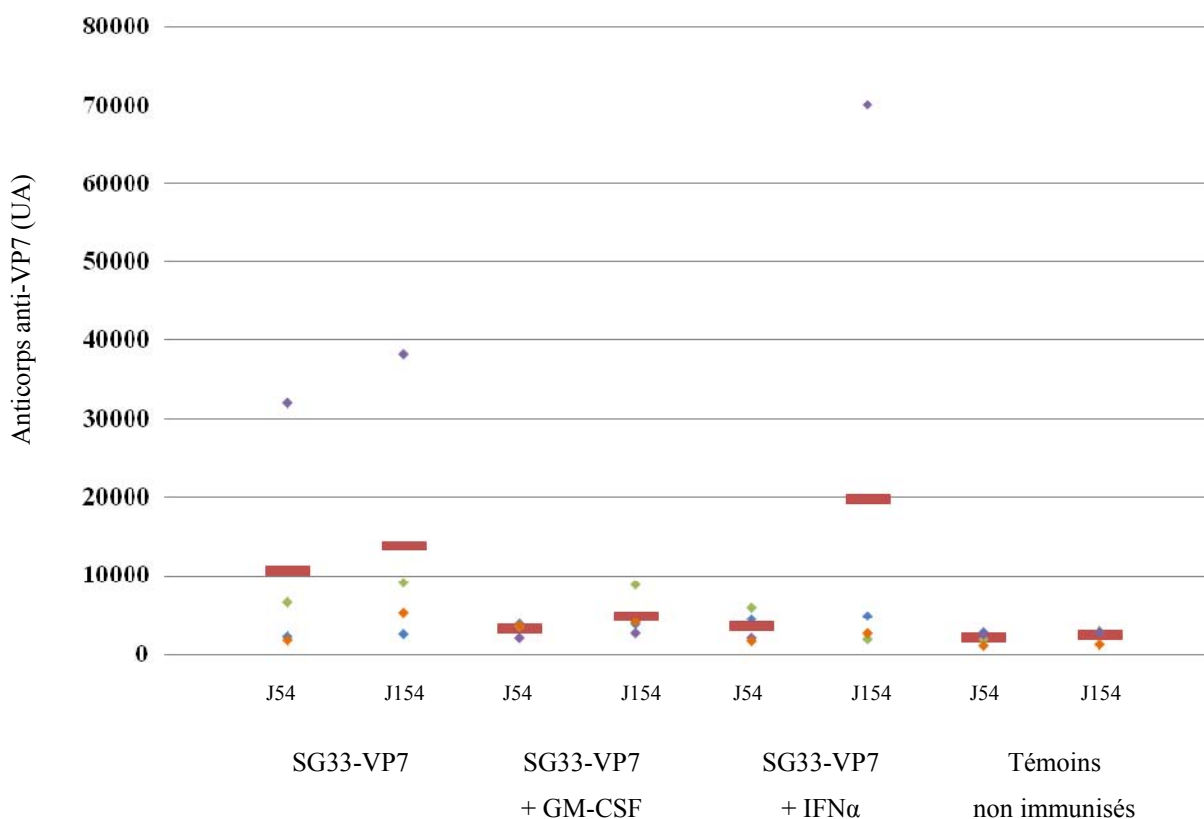
**Graphique 5 : Réponse anticorps anti-SG33-VP7 de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience**

Légende :

- Moyenne : ■
  - Les moutons immunisés respectivement avec le vecteur SG33-VP7, avec le vecteur adjuvé avec GM-CSF ou IFN $\alpha$  et les témoins non immunisés sont numérotés arbitrairement de 1 à 4.
- ◆ 1      ◆ 3  
◆ 2      ◆ 4

SG33-VP7			SG33-VP7 + GM-CSF			SG33-VP7 + IFN $\alpha$					
	J24	J54	J154		J24	J54	J154		J24	J54	J154
<b>1</b>	1059	4060	9156	<b>1</b>	7503	67261	65203	<b>1</b>	2984	838	6437
<b>2</b>	1794	7270,9	10648	<b>2</b>	5520	11873	18504	<b>2</b>	2444	8077	25810
<b>3</b>	788	3817	6279	<b>3</b>	2028	60650	18876	<b>3</b>	3553	9981	29599
<b>4</b>	229	1681	15100	<b>4</b>	3167	1845	13560	<b>4</b>	1048	4144	1229
<b>moyenne</b>	967	4207	10295	<b>moyenne</b>	4554	35407	29035	<b>moyenne</b>	2507	5760	15768

Le graphique 6 présente la réponse anticorps anti-VP7 après deux immunisations (J54 et J154) de l'ensemble des groupes de moutons intégrés à l'expérience. **La réponse anticorps contre VP7 est détectable.** Elle est plus élevée chez les moutons ayant reçu une immunisation avec le vecteur SG33-VP7 sans adjuvant ; on n'observe donc pas d'effet des adjuvants.



**Graphique 6 : Réponse anticorps anti-VP7 de l'ensemble des moutons intégrés à l'expérience**

Légende :

- Moyenne : ■
  - Les moutons immunisés respectivement avec le vecteur SG33-VP7, avec le vecteur adjuvé avec GM-CSF ou IFN $\alpha$  et les témoins non immunisés sont numérotés arbitrairement de 1 à 4.
- ◆ 1      ◆ 3  
◆ 2      ◆ 4

	SG33-VP7		SG33-VP7 + GM-CSF		SG33-VP7 + IFN $\alpha$		Témoins non immunisés		
	J54	J154	J54	J154	J54	J154	J54	J154	
<b>1</b>	2145	2472	<b>1</b>	3744	<b>1</b>	4395	<b>1</b>	2687	2456
<b>2</b>	6611	9088	<b>2</b>	3461	<b>2</b>	5928	<b>2</b>	1880	2839
<b>3</b>	31970	38275	<b>3</b>	2023	<b>3</b>	2016	<b>3</b>	2480	2733
<b>4</b>	1823	5269	<b>4</b>	3570	<b>4</b>	1701	<b>4</b>	1140	1298
<b>moyenne</b>	10637	13776	<b>moyenne</b>	3200	<b>moyenne</b>	3510	<b>moyenne</b>	2047	2332

- Des réponses anticorps anti-SG33-VP7 et anti-VP7 ont été détectées après deux injections. On en déduit, par conséquent, que le virus SG33-VP7 ainsi que le transgène sont capables d'induire une réponse immunitaire avec production d'anticorps après un rappel seulement.
- Il semble que GM-CSF en tant qu'adjuvant stimule la réponse humorale contre SG33-VP7, mais la grande hétérogénéité des résultats ne permet pas de conclure de façon certaine.

## 2. Séroneutralisation

Dans le cadre de cet essai, nous avons cherché à identifier la présence d'anticorps neutralisants le virus SG33, et surtout d'anticorps neutralisant le BTV 2.

Dans nos conditions, la séroneutralisation est considérée comme significative pour une dilution supérieure au  $1/8^{\text{ème}}$ .

### *a. Séroneutralisation du vecteur vaccinal SG33*

En présence d'anticorps neutralisants, l'ECP du virus est inhibé. Le principe général de la séroneutralisation consiste à lever l'inhibition du développement de l'ECP d'un virus en présence de dilutions croissantes du sérum à tester. L'inhibition de l'ECP en présence du sérum à tester est d'autant plus importante, que le sérum est peu dilué et contient une concentration importante d'anticorps neutralisants. Les résultats que nous avons obtenus sont difficilement interprétables puisque même à des dilutions très faibles du sérum, aucune inhibition de l'ECP du virus n'a été observée.

### *b. Séroneutralisation du BTV 2 (homologue)*

Dans le cas de quatre moutons dont deux appartenant au groupe 4 immunisé avec le vecteur SG33-VP7 adjuvé avec IFN- $\alpha$  et deux appartenant au groupe 2 immunisé avec le vecteur non adjuvé, on compte de deux à neuf plages d'ECP à la dilution  $1/2$  du sérum alors que l'ECP est très important à la dilution  $1/8^{\text{ème}}$ . Ces résultats vont dans le sens d'une inhibition du pouvoir cytopathique du virus. Cependant, on ne peut pas considérer qu'il y a une séroneutralisation spécifique. Seule la séroneutralisation à partir de la dilution  $1/8^{\text{ème}}$  étant considérée comme significative, il aurait fallu qu'aux plus faibles dilutions (inférieures à



1/8<sup>ème</sup>) on n'observe pas de plages de lyse ou moins de plages de lyse qu'à la dilution 1/8<sup>ème</sup>, ce qui n'était pas le cas dans nos expériences.

Le contrôle positif présente un effet séroneutralisant jusqu'à la dilution 1/16<sup>ème</sup>. Cependant ce résultat n'est pas comparable aux résultats des sérums à tester car le sérum du contrôle positif n'a pas été décomplémenté.

- L'immunisation des moutons à l'aide du vaccin recombinant vectorisé SG33-VP7, qu'il soit adjuvé ou pas **ne semble pas induire la production d'anticorps neutralisant contre BTV 2.**

## C. Epreuve virulente

Dix moutons ont été éprouvés environ 10 mois après la première immunisation avec la souche BTV 8 (souche hétérologue) en confinement A3 : cinq moutons immunisés à l'ENVT sélectionnés parmi les meilleurs répondeurs, et cinq moutons contrôles non immunisés. Le jour de l'épreuve virulente est noté J0.

### 1. Protection clinique

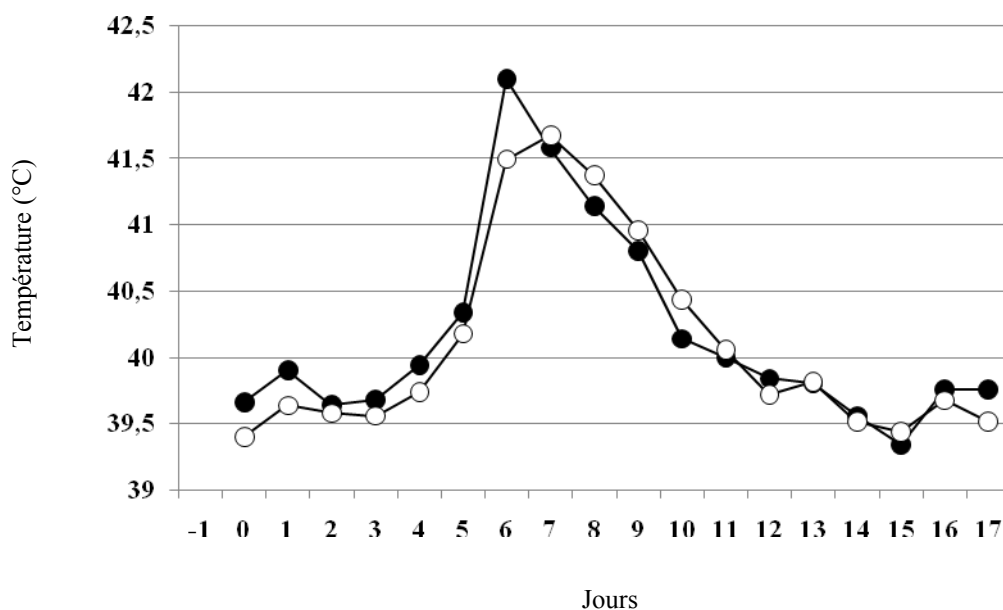
L'examen clinique a été réalisé deux fois par jour de J-1 à J17. Il comprend une mesure de la température rectale, l'identification des signes cliniques et l'appréciation de leur intensité en fonction d'une note (de 1 à 4) présentée sur le tableau 2 (Partie II. I. E. 1.), pour le calcul d'un score global.

#### *a. Température rectale*

Le graphique 7 représente les variations des moyennes des températures des ovins des groupes immunisé et contrôle. La température rectale physiologique d'un mouton se situe autour de 39-39,5 °C.

Après l'inoculation, la température rectale a augmenté à partir de J3 jusqu'à un pic autour de 42 °C à J6. Puis la température retrouve des valeurs physiologiques après J15.

Le profil de la moyenne des températures de chacun des deux groupes est similaire : on observe un pic thermique consécutif à l'épreuve virulente avec des températures dépassant 41,5 °C. Il n'y a pas de différence significative entre le groupe témoin et le groupe immunisé.



**Graphique 7 : Suivi de la température des moutons soumis à l'épreuve virulente (BTV2)**

Légende :

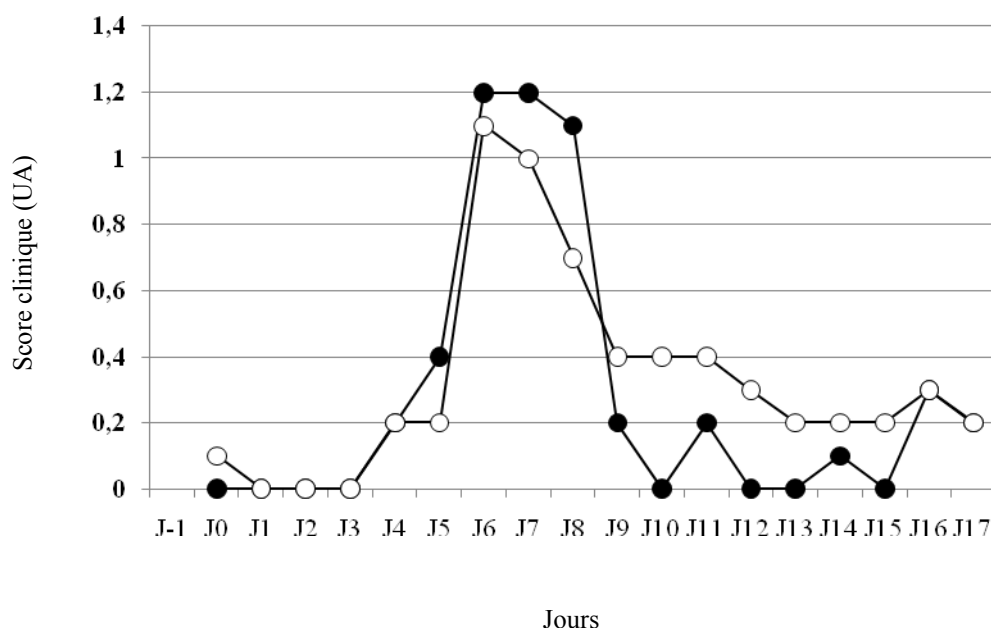
- Moutons immunisés
- Moutons non immunisés

### *b. Score clinique global*

Le graphique 8 présente l'évolution de la moyenne des scores cliniques de chaque groupe au cours de l'expérimentation de J0 (jour de l'épreuve virulente) à J17.

Les courbes de score clinique ont un profil identique entre les deux groupes d'animaux, caractérisé par une augmentation des scores cliniques à partir de J5.

D'après le test de Mann et Whitney, les séries comportant des effectifs de cinq ovins, la différence entre les deux effectifs n'est pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5 \%$ .



**Graphique 8 : Evolution du score clinique au cours de l'épreuve virulente**

Légende :

- Moutons immunisés
- Moutons non immunisés

- Aucune différence clinique entre les animaux immunisés et non immunisés n'a pu être observée. Par conséquent, la vaccination avec le vecteur SG33-VP7 ne permet **aucune protection clinique** contre une infection par BTV 8.

## 2. Détection des anticorps anti-VP7 par ELISA de compétition

Ce test sérologique a été effectué à l'aide de l'ELISA par compétition de liaison. D'après le manuel du kit utilisé (ID Sreen® Bluetongue Competition), nous avons considéré notre test valide dans la mesure où :

- La valeur moyenne des DO des contrôles négatifs ( $DO_{CN}$ ) est supérieure à 0,7 :  $DO_{CN} > 0,7$
- La valeur moyenne des DO des contrôles positifs ( $DO_{CP}$ ) est inférieure à 30 % de la  $DO_{CN}$  :  $DO_{CP} / DO_{CN} < 0,3$

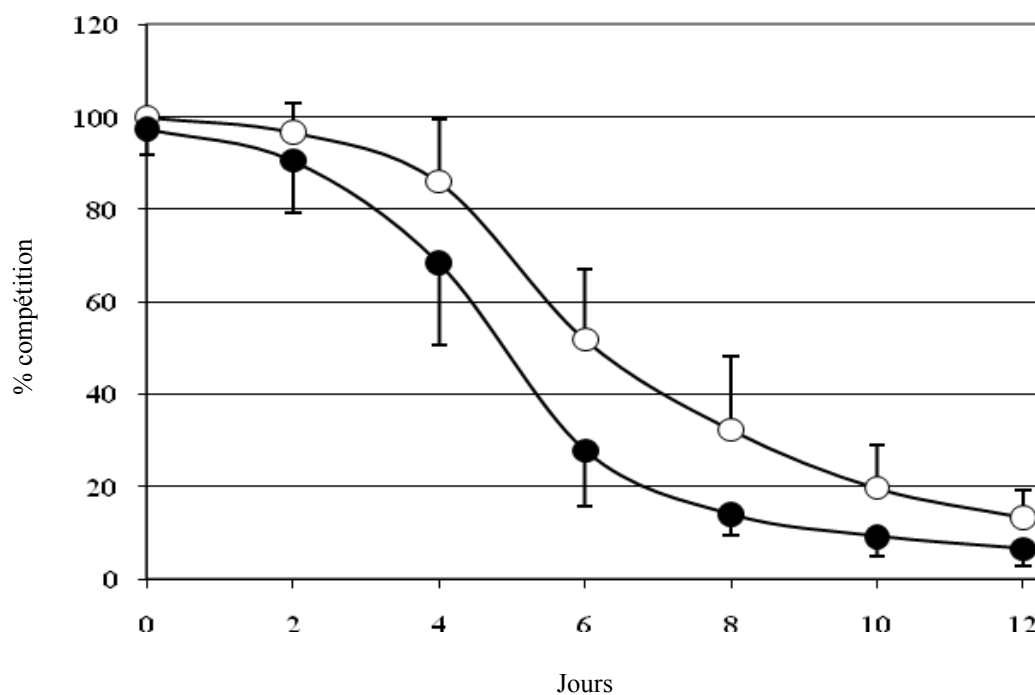
Nous avons calculé le pourcentage de compétition (% compétition) à l'aide de la formule suivante :  $\% \text{ compétition} = [ DO_{\text{échantillon}} / DO_{CN} ] \times 100$

Les échantillons présentant un pourcentage de compétition :

- Inférieur ou égal à 35 % sont considérés comme positifs.
- Supérieur à 35 % et inférieur ou égal à 45 % sont considérés comme douteux.
- Strictement supérieurs à 45 % sont considérés comme négatifs.

Dans l'ELISA de compétition, plus haute est la concentration initiale de l'anticorps plus faible est le signal. Le signal décroît au cours du temps, lié à un défaut de fixation de l'anticorps monoclonal marqué sur l'antigène et donc à une augmentation du taux d'anticorps dans l'échantillon.

On constate sur le graphique 9 que **la réponse humorale contre VP7 se développe plus rapidement chez les animaux vaccinés** que chez les animaux témoins. Elle est **plus précoce de 3 jours** chez les moutons immunisés. Ceci suggère la présence d'une réponse immunitaire mémoire qui permet un développement plus rapide de la réponse anticorps à la suite de l'épreuve virulente.



Graphique 9 : ELISA par compétition de liaison sur les sérums des animaux soumis à l'épreuve virulente

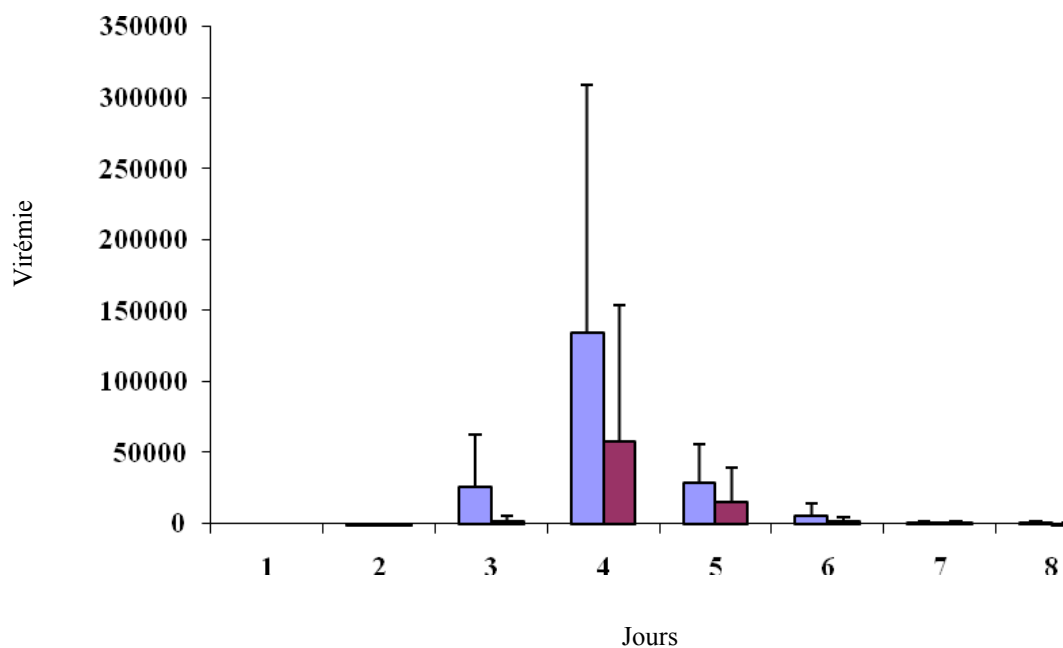
Légende :

- Moutons immunisés
- Moutons non immunisés

Selon le test de comparaison de moyennes, **les moyennes des pourcentages de compétition à J6 des deux groupes** de cinq moutons (immunisés et non immunisés), sont **significativement différentes** avec un risque  $\alpha = 0,05$ .

### 3. Mesure de la virémie

La virémie a été mesurée quotidiennement de J0 à J8 sur l'ensemble des moutons soumis à l'épreuve virulente. On observe sur le graphique 10 un pic de la virémie J4 pour l'ensemble des animaux. Les virémies des animaux immunisés (en mauve) sont plus élevées que celles des animaux contrôles. Ainsi, **la vaccination à l'aide de SG33-VP7 ne permet pas un contrôle de la virémie.**



**Graphique 10 : Mesure de la virémie des moutons soumis à l'épreuve virulente par PCR quantitative**

Légende :

- Moutons immunisés
- Moutons non immunisés

D'après le test de Mann et Whitney, les séries comportant des effectifs de cinq ovins, la différence entre les deux effectifs n'est pas significative avec un risque  $\alpha \leq 5 \%$ .

## D. Bilan

D'après les résultats que nous avons obtenus, les LT CD4 sont activés en présence de SG33-VP7.

Par ailleurs, nous avons pu détecter une réponse anticorps anti-SG33-VP7 et anti-VP7 après deux injections du vaccin recombinant SG33-VP7. On en déduit, par conséquent, que ce dernier est capable d'induire une réponse immunitaire avec production d'anticorps et une réponse cellulaire CD4.

Par contre, les anticorps neutralisant le BTV ne sont pas produits suite à la vaccination.

Comme l'a montré l'épreuve virulente, la vaccination ne confère aucune protection clinique et ne prévient pas la virémie.

En outre, en suivant la sérologie des animaux soumis à l'épreuve virulente, nous avons constaté que la réponse humorale contre VP7 se développe plus rapidement chez les animaux vaccinés que chez les animaux témoins même si elle ne confère aucune protection. Ceci suggère la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire. Les cinq moutons considérés comme les meilleurs répondeurs que ce soit pour la réponse cellulaire ou pour la réponse humorale ont été sélectionnés pour l'épreuve virulente, comme indiqué dans le tableau 3. Ainsi, la précocité de la réponse observée chez ces animaux lors du test ELISA par compétition de liaison est certainement associée à une réponse CD4 plus forte ou à la présence de LB mémoires chez les animaux que nous avons choisis. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment (Partie I. III. C 2.) la réponse CD4 est représentée par les LTh qui favorisent la formation plus intense et plus précoce des anticorps (Jeggo *et al.*, 1982 - 35). Les LTh peuvent être présents parmi les cellules mémoires spécifiques du BTV et faciliter aussi la réponse cytotoxique. Nous savons par ailleurs qu'ils augmentent la sensibilité des cellules infectées à l'action des LTc et qu'ils favorisent l'activité des NK (Jeggo *et al.*, 1984 - 34).

Enfin, en ce qui concerne la complémentation du vaccin à l'aide d'adjuvants il semble que GM-CSF en tant qu'adjuvant stimule la réponse humorale et favorise une réponse cellulaire CD4 contre SG33-VP7 de plus forte intensité.

Le tableau 3 récapitule l'ensemble des résultats que nous avons obtenus.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de l'essai vaccinal avec le vecteur SG33-VP7

		SG33-VP7				SG33-VP7+ GM-CSF				SG33-VP7+ IFN $\alpha$			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Réponse humorale</b>	<b>Anticorps anti-SG33-VP7</b>	++	+++	+	+++	++++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+/-
	<b>Anticorps Anti-VP7</b>	-	++	+++	-	+	-	++	+	++	+/-	++++	-
<b>Réponse cellulaire</b>	<b>Dirigée contre SG33-VP7</b>	+	+	+	-	++	+	+++	-	-	+	+	++
	<b>Dirigée contre VP7</b>	Problème de pureté de la protéine et de quantité utilisée pour stimuler la réponse CD4											
<b>Séronéutralisation</b>	<b>SG33</b>	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	-
	<b>BTV2 atténué</b>	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-

Légende :

- ++++ Réponse très positive
- +++ Réponse observée
- ++ Faiblement positif
- +/- Indéterminable
- Négatif

Les cinq moutons considérés comme les meilleurs répondants ont été sélectionnés pour participer à l'épreuve virulente. Ils apparaissent encadrés en rouge sur le tableau 3.

### **III. Discussion**

Nous avons montré qu'un Poxvirus recombiné exprimant la protéine VP7 du BTV 2 n'offre aucune protection clinique ou virologique lorsqu'il est utilisé pour vacciner des ovins, alors que ce vecteur vaccinal est capable d'induire dans cette espèce une réponse cellulaire CD4 et une réponse anticorps.

Cet essai poursuivait plusieurs objectifs simultanément. Le premier d'entre eux était l'évaluation des capacités immunogènes d'un Poxvirus recombiné exprimant une protéine du BTV. Le deuxième objectif était d'évaluer les capacités protectrices d'un tel vaccin contre le BTV chez les ovins alors que des données publiées suggéraient que l'immunisation vis-à-vis de VP7 conférait une protection hétérologue (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49).

La protéine VP7 est une CLP qui porte la spécificité de groupe du BTV car elle est très conservée entre tous les sérotypes du virus. Si elle était protectrice, une réponse vis à vis de VP7 permettrait par conséquent, une protection simultanée contre la totalité des 24 sérotypes du BTV. Cette possibilité qui offrirait des perspectives intéressantes et encore inédites à ce jour a été rarement envisagée, et n'a fait l'objet que d'un seul travail publié (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49). Le vaccin n'a pas permis la protection clinique des moutons, ni prévenu la virémie. Lors de l'épreuve virulente, les moutons ont été infectés avec du BTV 8, alors que la protéine VP7 intégrée au vaccin provenait d'un BTV 2. Le vaccin utilisé n'assure donc pas de protection lors d'un challenge hétérologue. Cependant, il faut noter que la séquence VP7 est extrêmement proche entre tous les sérotypes ; il ne s'agissait donc pas d'un challenge hétérologue à proprement parler.

Comme indiqué plus haut, nous avons montré que la vaccination à l'aide d'un Poxvirus recombiné était capable d'induire une réponse cellulaire CD4 et une réponse humorale. Néanmoins, les anticorps spécifiques de VP7 induits par la vaccination ne sont pas neutralisants et aucune protection clinique n'a été observée. En outre, même si nous avons détecté une réponse cellulaire vis-à-vis de SG33-VP7, nous avons eu des difficultés techniques à mettre en évidence la réponse spécifique de VP7, et nous ne pouvons pas conclure sur l'intensité de cette réponse chez les animaux vaccinés.



A ce stade des travaux, la question de l'origine de l'échec vaccinal se posait : s'agissait-il d'un défaut des capacités immunogènes du vecteur poxviral ou bien d'un mauvais choix de l'antigène d'immunisation?

## **A. Pouvoir immunogène du Poxvirus SG33 chez les ovins**

L'utilisation du MYXV en tant que vecteur vaccinal chez les ovins avait déjà été envisagée dans l'étude de Pignolet (Pignolet *et al.*, 2008 - 59). Dans cette étude le vaccin recombiné MYXV-RHDV, qui a été développé pour la vaccination du lapin contre ces deux maladies, a été inoculé à des moutons. Ce vaccin est constitué par la souche vaccinale SG33 du MYXV dans laquelle a été intégrée la protéine VP60 du RHDV. Une réponse humorale et cellulaire contre le vecteur et contre la protéine VP60 ont pu être mises en évidence à la suite de deux injections vaccinales. Dans la continuité de cette étude, notre objectif était d'intégrer dans le vecteur SG33, un transgène d'intérêt pour l'espèce ovine : nous avons choisi la protéine VP7 du BTV en raison de l'intérêt porté à ce virus qui était responsable d'une épizootie dans les élevages ovins européens.

La production de la protéine VP7 du BTV par le virus recombiné SG33 a pu être démontrée (Bozzetti, 2007 - 60) ; en outre, nous avons pu détecter une réponse humorale dirigée contre le vecteur et contre le transgène VP7. Pour la réponse cellulaire, nous pouvons seulement affirmer qu'une réponse dirigée contre le vecteur est présente, dans la mesure où nous ne sommes pas parvenus à révéler la réponse dirigée contre le transgène, essentiellement pour des raisons techniques. Le vecteur SG33 est donc un bon immunogène. Nous savions, en effet, qu'il était capable d'infecter les cellules de ruminants : un processus inflammatoire au site d'injection avait été mis en évidence lors d'une analyse histologique et immunohistochimique et des cellules infectées avaient été détectées dans le derme. De plus, l'activation non spécifique des lymphocytes, améliore de manière significative leur réceptivité au virus (Pignolet *et al.*, 2008 - 59).

Par ailleurs, la réponse anticorps persiste dans le temps puisque à la suite de l'épreuve virulente (environ 10 mois après la dernière immunisation), nous avons pu montrer à l'aide d'un ELISA par compétition de liaison, que la réponse anticorps apparaît plus précocement (trois jours environ) chez les animaux immunisés. Ainsi, non seulement le vecteur est suffisamment immunogène pour que des réponses immunitaires humorale et cellulaire

apparaissent, mais en plus la réponse humorale persiste dans le temps avec la mise en place probable d'une mémoire immunitaire.

Un vecteur vaccinal doit non seulement être immunogène mais il doit également garantir une grande sécurité d'emploi. Cela est le cas de notre vecteur. En effet, aucune réaction au point d'injection, ni d'effet secondaire n'ont été observés pendant l'étude confirmant les résultats précédemment obtenus par Bozzetti (Bozzetti, 2007 - 60). Dans cette étude, aucun signe clinique général, ni local au point d'injection, ni de virémie consécutive à l'injection n'avaient pu être mis en évidence. De plus, il a été montré que les fibroblastes ovins ne sont pas permissifs au MYXV, le niveau d'infection des PBMC ovins est très faible et le cycle de réplication dans les cellules ovines est abortif (Pignolet *et al.*, 2008 - 59). Par ailleurs, si l'immunisation n'a pas permis d'apporter un effet protecteur significatif, elle ne conduit pas non plus à une aggravation du tableau clinique.

Néanmoins, malgré toutes les qualités du vecteur SG33 que nous avons pu identifier au cours de cette étude et des expériences précédentes, il est vrai que la réponse anticorps que nous avons mesurée en ELISA indirect est très variable entre animaux. Cette hétérogénéité est peut être due à une variabilité de la réceptivité entre animaux. Plusieurs propositions peuvent être faites pour améliorer cette vaccination et diminuer la variabilité de la réponse :

- Augmenter la dose vaccinale : La quantité de MYXV injectée dans notre expérience est de  $2.10^7$  ufp. En comparaison, lors de l'étude qui a montré une bonne efficacité d'un vaccin recombiné CNPV-BTV (VP2/VP5) (Boone *et al.*, 2007 - 48), les chercheurs ont injecté  $6,3.10^8$  ufp de vaccin recombiné sous un volume de 1 ml. La dose vaccinale était par conséquent 30 fois plus élevée. De plus, l'équipe de Wade-Evans qui a utilisé un vecteur *Capripoxvirus* répliquatif chez le mouton exprimant la protéine VP7, a inoculé  $1,5.10^7$  ufp, soit à peu près la même quantité que celle que nous avons utilisée pour immuniser les ovins dans notre expérience alors que le vecteur myxomateux que nous utilisons est non répliquatif chez le mouton (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49). Cela signifie que la quantité de protéine recombinante exprimée par notre vecteur dans ces conditions est probablement inférieure à celles des deux autres essais.

- Changer la voie d'administration du vaccin : dans les études citées ci-dessus les voies d'administration étaient différentes : la voie sous-cutanée et la voie intramusculaire ont été utilisées. Nous avons choisi d'utiliser la voie ID. En effet, d'après une étude de Pignolet, le MYXV infecte préférentiellement les cellules de Langerhans qui sont des cellules dendritiques résidentes de la peau, et plus spécifiquement du derme (Pignolet *et al.*, 2008 - 59). Ceci suggère que l'immunisation avec ce virus par voie ID est à privilégier afin de cibler le plus possible cette population cellulaire. Bien que les cellules produites *in vitro* entrent en apoptose 16 heures après infection, ce temps est probablement suffisant pour que les cellules migrent jusque dans les nœuds lymphatiques où les corps apoptotiques (et l'antigène recombinant qu'ils contiennent) puissent être pris en charge et présentés par les cellules dendritiques résidentes.
  
- Réévaluer le nombre d'immunisations réalisées : on peut présumer qu'une fois que l'immunité est apparue, après deux injections au moins, l'effet d'une injection supplémentaire est peut être peu utile voire nuisible à la robustesse et à l'intensité de la réponse. En effet, la réponse cytotoxique provoquée par le virus SG33 peut entraîner la destruction des cellules de Langerhans « dans lesquelles » le virus recombiné s'exprime avant même que celles-ci n'aient le temps de stimuler la réponse spécifique de l'antigène recombinant. Ceci est d'autant plus vrai que nous avons utilisé un promoteur précoce-tardif pour l'expression du transgène. Dans l'étude de Wade-Evans ou encore celle de Boone dont les vaccins recombinés se sont avérés efficaces, deux immunisations à environ trois semaines d'intervalles ont été réalisées (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49) et (Boone *et al.*, 2007 - 48). Dans notre cas, les animaux ont reçu trois injections, la troisième étant réalisée 66 jours après la deuxième. Cette dernière injection a permis une augmentation du titre anticorps, indiquant que la réponse maximale n'avait pas encore été atteinte. Le gain permis par une injection supplémentaire est cependant difficile à prédire. Par ailleurs, dans les conditions d'utilisation normale d'un vaccin, il est difficilement envisageable pour des raisons pratiques, de réaliser plus de deux injections de primo-vaccination.
  
- Reconsidérer l'utilisation d'adjuvants :
  - o La tentative d'associer des cytokines connues pour leur effet adjuvant à l'injection vaccinale a produit un résultat mitigé. Ainsi, lorsque 2 µg d'IFNα ont été ajoutés à l'injection vaccinale, avec le vaccin recombiné SG33-VP7,

l'amplification de la réponse mesurée a été faible à nulle selon les animaux. Lorsque des cellules dendritiques sont infectées avec le MYXV, les voies de signalisations des IFN de type I sont très fortement activées, suggérant que soit le virus induit une forte production d'IFN de type I, soit qu'il est capable d'activer ces voies indépendamment de l'IFN. Ainsi, l'ajout d'IFN n'est peut être pas utile dans un contexte où les voies mobilisées par cette cytokine sont déjà très fortement induites.

- Nous avons inclus le GM-CSF dans cet essai à cause de ses propriétés adjuvantes liées à sa capacité à recruter des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au site de production, et pour ses propriétés de stimulation des cellules dendritiques. Nous avons injecté le GM-CSF sous sa forme protéique (donc non intégré au vecteur vaccinal) par voie ID à chaque immunisation. La réponse cellulaire LT CD4 et la réponse humorale sont apparues plus fortes chez les moutons ayant reçu GM-CSF comme adjuvant. Nous n'avons pas pu interpréter les résultats de la réponse LT CD8. En outre, les résultats de la réponse sont hétérogènes entre individus pour conclure de façon certaine sur l'action du GM-CSF. Nos résultats sont en adéquation avec ceux de l'étude de l'équipe de Réali qui a montré que l'administration sous-cutanée de GM-CSF intégré dans un *Fowlpox virus* [FWPV] (Poxvirus du poulet) non répliquatif à des souris, stimule la maturation et la prolifération des CPA et par là même amplifie la réponse immunitaire de l'hôte (Réali *et al.*, 2005 - 53). Cette action de GM-CSF est d'autant meilleure lorsque celui-ci est intégré dans le vecteur FWPV. Peut être que nous aurions optimisé l'action du GM-CSF en l'utilisant sous une forme recombinée du virus SG33, ou en l'intégrant à la construction virale en même temps que l'antigène recombinant.
- L'adjuvant Carbopol<sup>ND</sup> est parfois utilisé en tant qu'excipient dans les vaccins utilisant un Poxvirus dans d'autres espèces. Il s'agit d'un polymère d'acide acrylique réticulé par un composé poly-hydroxylé ayant au moins trois groupes hydroxyles. Ils sont particulièrement appropriés pour les vaccins recombinants utilisant des Poxvirus en tant que vecteur. En effet, le Carbopol<sup>ND</sup> 974P a fait la preuve de son efficacité à plusieurs reprises en tant qu'adjuvant: pour le vaccin recombinant CNPV-*West Nile virus* [WNV] (virus du Nil occidental) chez le

cheval (Garch *et al.*, 2008 - 61), ou encore dans la composition du vaccin recombinant CNPV-FLUAV équin (Paillot *et al.*, 2005 - 14).

En outre, différents adjuvants ont été utilisés avec succès en association avec un vaccin recombinant Baculovirus-VLP du BTV dans une étude de Roy. Il s'agit de l'hydroxyde d'aluminium, l'adjuvant incomplet de Freund ou encore l'adjuvant incomplet Seppic (Montanide ISA-50) (Roy *et al.*, 1992 - 42).

## **B. Choix de l'antigène recombinant pour la vaccination contre la FCO**

Wade-Evans et son équipe ont élaboré un vaccin recombinant *Capripoxvirus* exprimant la protéine VP7. Dans leur étude, l'ensemble des moutons (témoins et vaccinés) ont des signes cliniques lors d'une épreuve virulente hétérotypique, néanmoins seuls les animaux vaccinés à l'aide du vaccin recombinant *Capripoxvirus* exprimant la protéine VP7 survivent à l'épreuve virulente (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49). Il faut donc noter que le modèle expérimental utilisé est particulièrement sévère par rapport à celui que nous avons utilisé dans notre étude où le score clinique a été peu élevé, indiquant une sévérité bien moindre de la maladie. En outre, si les moutons vaccinés à l'aide de ce vaccin recombinant ont développé des anticorps anti-VP7 (détectés à l'aide d'un test ELISA), aucun anticorps neutralisant n'a été produit. Il s'agit de la seule étude rapportant l'utilisation d'un vaccin incluant une CLP du BTV qui assurerait la protection des animaux lors d'un challenge hétérologue en l'absence complète d'anticorps neutralisants.

Dans notre étude, alors que nous avons détecté une réponse humorale et cellulaire, tout comme dans l'étude de Wade-Evans en 1996 aucun anticorps neutralisant n'a cependant été produit (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49). En outre, le vaccin n'a offert aucune protection clinique à la suite de l'épreuve virulente. Alors que le vecteur que nous avons utilisé a déjà fait la preuve de son efficacité chez les ruminants comme décrit précédemment (Partie II. IV. A.) Plus récemment, d'autres équipes ont réalisé l'expérience en faisant exprimer la VP7 par un *Capripoxvirus* (vecteur répliquatif chez les ovins) ou un Adénovirus et n'ont obtenu aucune protection clinique. Les résultats obtenus vont donc dans le même sens que ceux de l'étude de Lobato en 1997 au cours de laquelle, la protéine VP7 produite par le virus recombiné VACV s'est révélée peu immunogène chez le mouton (Lobato *et al.*, 1997 - 47). Il semble donc que l'absence de protection ne soit pas liée au vecteur que nous avons utilisé, mais bien au choix de la protéine VP7 comme antigène

d'immunisation. Les résultats de Wade-Evans sont donc isolés et les observations les plus récentes contredisent leurs conclusions (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49). En outre, il est maintenant reconnu que la présence d'une réponse anticorps vis-à-vis de VP7 n'est pas nécessaire à la protection clinique et virologique des animaux.

Ainsi, nous pouvons formuler plusieurs hypothèses quant à l'inefficacité de la protéine VP7 comme antigène vaccinal :

- En raison de la position interne de la protéine par rapport à la capsid virale, VP7 n'est pas accessible aux anticorps. En effet, il s'agit d'une CLP qui, comme on peut le voir sur la figure 9, est entourée de la capsid. Celle-ci empêche probablement le contact entre VP7 et les anticorps.

- Par ailleurs, VP7 s'associe sous la forme d'un trimère et a donc une structure tridimensionnelle et une position caractéristique à la surface du core qui ne peut pas être reproduite lors de l'expression à partir du vecteur vaccinal. En effet, la coque externe est organisée en deux couches concentriques. La plus externe est constituée de grappes de protéines VP7 organisées en trimères. Ces trimères sont agencés en pentamères et hexamères, séparés par des canaux aqueux. Au total, on dénombre dans un virion, 780 protéines VP7, formant 260 trimères et 132 canaux dans les trois axes. Ainsi, la protéine possède une disposition particulière en capsomères à la surface du core du virus sauvage ; ces interactions entre protéines de BTV ont un rôle majeur dans l'interaction du couple antigène-anticorps (Roy, 1996 - 26).

- En outre, on n'observe pas de corrélation entre la présence d'anticorps spécifiques de groupe et l'immunité protectrice (Stott *et al.*, 1985 - 31).

- Enfin, la réponse contre VP7 ne porte pas d'effet séroneutralisant ; En 1981, Huismans et son équipe ont montré qu'un ascite de souris contenant un titre élevé d'anticorps fixant le complément spécifiques du BTV, et un titre très faible d'anticorps neutralisants, contient presque exclusivement des anticorps qui précipitent VP7 (Huismans *et al.*, 1981 - 29).

## C. VP2 une perspective pour l'avenir ?

A l'inverse de ce qui est connu pour la protéine VP7, la quantité d'anticorps précipitant VP2 dans le sérum est très bien corrélée aux titres des anticorps neutralisants chez le mouton infecté par le BTV (Huismans *et al.*, 1981 - 29). De plus, les VLP (VP2 et VP5) du BTV, peuvent être intégrées à un vecteur Baculovirus comme dans l'étude de Roy ou à un vecteur CNPV comme dans l'étude de Boone. Ces vaccins ont conféré une protection clinique chez des moutons ; celle-ci était dans les deux cas associée à un fort taux d'anticorps neutralisants, qui était même plus élevé lorsque VP2 était associée à VP5 (Roy *et al.*, 1990 - 44) et (Boone *et al.*, 2007 - 48). Ainsi, les VLP sont hautement immunogènes et offrent une nouvelle approche pour la vaccination contre la FCO.

A partir des informations acquises au cours de notre essai et de ces constats, des travaux récents ont été réalisés en utilisant un vaccin recombinant SG33-VP2. De forts titres d'anticorps neutralisants ont été détectés après deux immunisations seulement, et les animaux vaccinés ont été protégés lors d'une épreuve virulente homologe. Cette étude offre des perspectives très intéressantes pour l'utilisation d'un vaccin recombiné SG33-VP2 dans la lutte contre la FCO, ou plus généralement pour l'utilisation de ce vecteur vaccinal chez les petits ruminants.

Les anticorps spécifiques de VP2 neutralisent le virus et assurent une protection passive contre l'infection par un sérotype homologe mais généralement peu ou pas de protection vis-à-vis d'un sérotype hétérologue. Néanmoins, considérant l'émergence de plusieurs sérotypes en Europe et notamment en France ces dernières années, il serait très intéressant de combiner dans un seul vaccin, la protection contre l'ensemble des sérotypes présents. Dans cette optique, VP7 nous était apparue très intéressante comme transgène dans le cadre de la vaccination contre la FCO puisqu'il s'agit de l'antigène de groupe du BTV (Gumm *et al.*, 1982 - 27), néanmoins nos résultats associés à ceux des autres équipes montrent que tel n'est pas le cas.

## **D. A la recherche de l'induction d'une réponse immunitaire hétérotypique**

Il ne semble pas judicieux de vacciner simultanément contre tous les sérotypes présents dans une région, comme cela a été réalisé jusque là en Afrique et comme cela est pratiqué actuellement en France. En effet, l'inoculation simultanée chez un même animal de différents sérotypes du BTV n'entraîne pas de réponse hétérotypique large. Elle diminue même parfois le spectre de la réponse immunitaire (Jeggo *et al.*, 1983 - 62). Dans une étude de Jeggo et son équipe, les moutons ayant subi deux inoculations de BTV atténué de sérotypes différents, l'inoculation d'un second sérotype dans les 14 jours qui suivaient la première inoculation, n'assurait pas une bonne protection contre le second sérotype (Jeggo *et al.*, 1986 - 36). Après avoir montré que la réponse humorale n'assure pas la protection hétérologue qui semble plutôt être conférée par les LTc, Jeggo a suggéré dans cette étude qu'une inoculation séparée dans le temps de trois à quatre semaines de différents sérotypes permettrait à la réponse cellulaire de se mettre en place et assurerait ainsi une protection hétérologue correcte (Jeggo *et al.*, 1986 - 36). Ce phénomène correspond peut être à ce qui a été observé pour le virus de la poliomyélite, pour lequel des interférences entre sérotypes existent lors de l'inoculation simultanée de plusieurs virus de différents sérotypes (Jeggo *et al.*, 1984 - 63). De plus, tous les sérotypes n'ont pas la même capacité à stimuler la réponse immunitaire et à induire une immunité protectrice. Ainsi, Jeggo et Wardley ont montré en 1982 qu'en fonction du sérotype, des niveaux de réponse cellulaire cytotoxique (LTc) très différents sont observés (Jeggo *et al.*, 1982 - 35). On peut donc supposer que certains sérotypes engendrent une réponse LTc telle, qu'elle restreint fortement l'expression des autres sérotypes et donc la réponse immunitaire à leur égard. Il en est peut être de même lors de l'inoculation d'un second sérotype moins de 14 jours après une première inoculation. En conséquence, la réponse vis-à-vis des différents sérotypes inclus dans un vaccin multivalent n'est pas équivalente (Jeggo *et al.*, 1986 - 36). Ainsi, l'utilisation de vaccins multivalents et réplicatifs (virus vivants atténués) est non seulement inutile mais risque en plus d'aboutir à des résultats plus que hasardeux et non souhaités ; ce n'est peut être pas le cas des vaccins recombinants non réplicatifs, bien que cela reste à démontrer.

Si la cible choisie est VP2, il serait alors possible d'intégrer dans un seul vecteur recombinant plusieurs séquences codant la VP2 de différents sérotypes. Cette approche peut



cependant poser un certain nombre de difficultés au moment de la construction du vecteur recombiné.

Toutefois, concernant la réponse immunitaire hétérotypique, le BTV présente des particularités, comme le montre une étude de Jeggo de 1986. Dans cette étude une bonne protection clinique et virologique est observée chez les animaux immunisés avec un BTV 4 vivant atténué lors d'un challenge homologue, alors qu'un challenge hétérologue avec un BTV 3 entraîne l'apparition de signes cliniques, une virémie ainsi que la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les sérotypes 3, 4 mais également contre le sérotype 6, alors que les animaux n'avaient jamais été en contact avec ce sérotype auparavant. Si les animaux sont ensuite infectés avec BTV 6, les moutons ne développent pas la maladie, et il n'y a pas de virémie. Dans ce cas, l'immunisation vis à vis des sérotypes 3 et 4 a permis de protéger les animaux non seulement contre ces sérotypes, mais aussi vis-à-vis du sérotype 6 (Jeggo *et al.*, 1986 - 36). Ce phénomène pourrait permettre de vacciner contre plusieurs sérotypes en intégrant dans un vaccin un nombre restreint de protéines VP2 de sérotypes différents s'il est transposable à d'autres sérotypes.

## **E. L'implication de la réponse cellulaire, une piste à suivre ?**

La particularité du vecteur Poxvirus est d'être capable d'induire une bonne réponse cellulaire CD4. Par contre nous avons recueilli peu de données sur l'induction de la réponse LT CD8.

La quantité d'anticorps neutralisants après une épreuve virulente n'est pas obligatoirement corrélée à la qualité de la protection, ce qui suggère que les autres types d'anticorps et la réponse cytotoxique participent également à la protection. On peut donc supposer, que les anticorps neutralisants ne sont pas les seuls moyens de défense efficaces mobilisés par l'organisme, d'autant plus qu'il a été montré que des agneaux sous protection colostrale peuvent être résistants au BTV sans qu'une réponse anticorps neutralisante soit détectée après le challenge (Jeggo *et al.*, 1984 - 30).

En outre, toutes les protéines du BTV ne sont pas reconnues avec la même fréquence par les LTc. NS1 et VP2 sont plus fréquemment reconnues (Janardhana *et al.*, 1999 - 64), alors que VP7, VP5 ou encore NS3 le sont peu, voire pas du tout (Andrew *et al.*, 1995 - 33). Il existe deux ou trois régions de chacune de ces protéines qui contiennent des épitopes

potentiels car conservés entre individus. Ainsi, si les LTc ne sont spécifiques que d'une seule protéine, ils identifient plusieurs épitopes sur celle-ci dont les séquences varient en fonction des sérotypes. L'intervention de l'immunité cellulaire est encore à préciser alors que son rôle semble primordial dans la protection hétérologue. La diversité de la réponse cellulaire cytotoxique est très grande chez les animaux. Ainsi, les vaccins sous-unitaires devraient contenir plusieurs épitopes pour assurer une bonne couverture de la totalité d'une population (Janardhana *et al.*, 1999 - 64). Nous avons vu précédemment que VP2 est très variable et spécifique de chaque sérotype, alors que NS1 est très conservée entre tous les sérotypes. Ainsi, il a été montré que les LTc qui interviennent dans la réaction immunitaire hétérotypique sont essentiellement spécifiques de NS1 mais pas de VP2. VP7 est également un antigène très conservé, mais les LTc spécifiques de VP7 n'ont pas pu être mis en évidence (Andrew *et al.*, 1995 - 33). Ainsi pour maximiser l'effet protecteur d'une nouvelle formulation vaccinale, peut être qu'une association de VP2 et NS1 pourrait être envisagée. Elle permettrait alors d'assurer une protection hétérologue qui est un des objectifs des travaux à venir.

# CONCLUSION

La souche vaccinale SG33 du MYXV utilisée en tant que vecteur vaccinal recombinant contre la FCO chez les petits ruminants présente un certain nombre de qualités puisque son utilisation a confirmé son innocuité ainsi que son potentiel immunogène dans une espèce différente de l'espèce cible. Un certain nombre de modifications seront à prendre en compte. Elles permettraient une amélioration de l'efficacité de ce vecteur dans cette espèce et éventuellement l'extension de son utilisation à d'autres espèces.

Compte tenu de la diversité antigénique du BTV, l'idée d'utiliser la protéine VP7 en tant qu'antigène de groupe, qui avait fait la preuve de son efficacité dans une étude publiée de Wade-Evans nous était apparue tout à fait indiquée pour l'élaboration d'un vaccin recombinant contre la FCO (Wade-Evans *et al.*, 1996 - 49).

Cependant, alors que l'immunisation des ovins avec un vecteur recombiné SG33-VP7 a permis le développement d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire, l'épreuve virulente s'est révélée particulièrement décevante. Cet essai vaccinal a tout de même apporté beaucoup d'informations sur les capacités immunogènes du vecteur et par exemple la présence d'une réponse immunitaire mémoire. La vaccination avec la protéine VP7 s'est néanmoins montrée insuffisante pour assurer la protection clinique des moutons à la suite d'une épreuve virulente. Cette absence de protection semble être corrélée à un défaut de production d'anticorps neutralisant le virus, contrairement aux résultats récemment obtenus en utilisant la protéine VP2 en lieu et place de la protéine VP7.

Ces nouvelles investigations ouvrent des perspectives très intéressantes quant à l'élaboration d'un vaccin recombinant associant le MYXV et possiblement plusieurs protéines VP2 si le choix de protéger les animaux vis-à-vis de plusieurs sérotypes était fait. De nombreux défis restent cependant à relever avant d'atteindre cet objectif.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

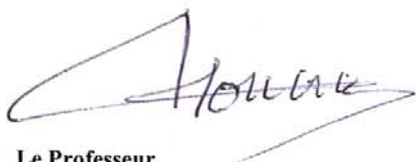
Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**Melle CARUSO Agathe**  
a été admis(e) sur concours en : 2003  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 10 juillet 2008  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
autorise la soutenance de la thèse de :  
**Melle CARUSO Agathe**

intitulée :

« Evaluation de la protéine VP7 pour la protection des ovins vis-à-vis du virus Bluetongue (BTV) lors d'un essai vaccinal utilisant le vecteur Poxvirus SG33 »



**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Gilles FOUCRAS**



**Vu :**  
**Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON**

**Vu :**  
**Le Président de la thèse :**  
**Professeur Jacques IZOPET**



**Vu le :** 24 NOV. 2009  
**Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Gilles FOURTANIER**



# BIBLIOGRAPHIE

1. ELOIT, M.

Vaccins traditionnels et vaccins recombinants

*INRA Prod. Anim.*, 1998, **11**, 1, 5-13

2. VAN OIRCHOT, J.T., GIELKENS A.L.J., MOORMAN R.J.M.

Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease.

*Veterinary Microbiology*, 1990, **23**, 85-101

3. ULMER, J.B., DONELLY, J., PARKER, S.E., *et al.*

Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein

*Science*, 1993, **259**, 1745-1749

4. PASTORET, P.-P., VANDERPLASSCHEN, A.

Poxviruses as vaccine vectors

*CIMID*, 2003, **26**, 343-355

5. MOSS, B.

Poxviridae: The viruses and their replication

In : Fields Virology, Fourth Edition

Edited by Knipe, D. M., Howley, P. M.

Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, 2649-2883

6. MESSUD-PETIT, F., BERTAGNOLI, S.

Le virus myxomateux : de l'agent pathogène au vecteur vaccinal

*Virologie*, Novembre-Décembre, 2000, **4**, n°6, 453-462

7. MOSS B.

Genetically engineered Poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Octobre, 1996, **93**, 11341-11348

8. BLANCOU, J., KIENY, M. P., LATHE, R., *et al.*

Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus

*Nature*, Juillet, 1986, **322**, 373-375

9. PAOLETTI E.

Applications of pox virus vectors to vaccination : an update

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, October, 1996, **93**, 11349-11353, Colloquium paper

10. TARTAGLIA, J., JARRET, O., NEIL, J. C., DESMETTRE, P., PAOLETTI, E.

Protection of cats against Feline Leukemia Virus by Vaccination with a Canarypox Virus

Recombinant, ALVAC-FL

*Journal of Virology*, Avril, 1993, **67**, n°4, 2370-2375

11. MERIAL, (Page consultée le 10 mai 2008), Information sur la dissémination d'un virus recombiné canarypox-FeLV (vCP97) dans le cadre d'un essai terrain d'innocuité du vaccin RMB696, [online]. Adresse URL : <http://www.biosafety.be/DTB/deliberate-releases-of-gmo-medicinal-products/Development-of-a-combined-live-vaccine-against/b-be-99-vw8-fiche-dinformation-destinee-au-public/download>

12. GROSENBAUGH, D. A., LEARD, T., PARDO, M. C.

Protection from challenge following administration of a canarypox virus- vectored recombinant feline leukaemia virus vaccine in cats previously vaccinated with a killed virus vaccine

*JAVMA*, Mars, 2006, **228**, n°5, 726-727

13. MERIAL, (Page consultée le 10 mai 2008), Information sur l'essai clinique des virus canarypox recombinants vCP1529 et vCP1533 exprimant les antigènes protecteurs de virus de la grippe équine, dans le cadre d'essais de terrains d'efficacité et d'innocuité du vaccin associé, [online]. Adresse URL : RMB715-20 <http://www.biosafety.be/DTB/deliberate-releases-of-gmo-medicinal-products/development-of-a-combined-vaccine-against-equine/b-be-00-v15-fiche-dinformation-destinee-au-public/download>

14. PAILLOT, R., KYDD, J. H., SINDLE, T., *et al.*  
Antibody and IFN responses induced by a recombinant canarypox vaccine and challenge infection with equine influenza virus  
*Veterinary immunology and immunopathology*, 2006, **112**, n° 3-4, 225-233
15. SAURAT, P., GILBERT, Y., GANIERE J.-P.,  
Etude d'une souche de virus myxomateux  
*Rev Med Vet*, 1978, **129**, 415-451.
16. BERTAGNOLI, S., GELFI, J., LE GALL, G., *et al.*  
Protection against Myxomatosis and Rabbit Viral Hemorrhagic Disease with recombinant Myxoma Viruses expressing Rabbit Hemorrhagic Disease Virus capsid protein  
*Journal of Virology*, Août, 1996, **70**, n° 8, 5061-5066
17. McCABE, V.J., TARPEY, I., SPIBEY, N.  
Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein  
*Vaccine*, 2002, **20**, 2454-2462
18. CIRAD. (Page consultée le 25 avril 2008). Surveillance fièvre catarrhale du mouton, [online]. Adresse URL : <http://bluetongue.cirad.fr>
19. NIANG, A. Manuel terrestre de l'OIE 2005. [online]. Juin 2005. chapitre 2.1.9. Fièvre catarrhale du mouton (bluetongue). 220-236.  
Available from World Wide Web : [http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/f\\_summry.html](http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/f_summry.html)
20. ALBINA, E., ZIENTARA, S., SAILLEAU, C., *et al.*  
La fièvre catarrhale ovine (bluetongue) : quand une maladie du sud s'invite au nord  
*Virologie*, Janvier-Février, 2007, **11**, n°1, 63-74
21. MINISTERE DE L'ALIMENTATION DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE.  
(Page consultée le 15 septembre 2009). Site du ministère de l'alimentation de l'agriculture et de la pêche, [online]. Adresse URL : <http://agriculture.gouv.fr/>

22. RESEAU FRANÇAIS POUR LA SANTE ANIMALE. (Page consultée le 15 mai 2009).  
Réunion d'information et d'échanges : recherche opérationnelle FCO en France ; premières  
réponses, 21 janvier 2009. Conférence introductive par DOMINGUEZ, M. La FCO en France  
et en Europe -2006-2008- Adresse URL :

<http://www.rfsa.net/MANIFESTATIONS/2009/FCO/Resumes/01MDominguez.pdf>

23. FCO info. (Page consultée le 15 septembre 2009). Situation de la France fin mai 2009,  
[online]. Adresse URL: <http://www.fcinfo.fr/spip.php?article356>

24. HUNTER, P., MODUMO, J.

A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous  
protection in sheep

*Onderstepoort J. Vet. Res.*, 2001, **68**, 331-333

25. VERWOERD, D. W., ELS, H. J., DE VILLIERS, E-M., HUISMANS, H.

Structure of the Bluetongue Virus capsid

*Journal of Virology*, Octobre, 1972, **10**, n°4, 783-794

26. ROY P.

Orbiviruses and their replication

In : FIELDS B. N., KNIPE D. M., HOWLEY P. M.

Fields Virology, Third Edition, Volume 2

Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1709 – 1734

27. GUMM, I. D., NEWMAN, J. F. E.

The preparation of purified Bluetongue Virus group antigen for use as a diagnostic reagent

*Archives of Virology*, 1982, **72**, 83-93

28. SPENCE, R. P., MOORE, N. F., NUTTAIL, P.A.

The biochemistry of Orbiviruses Brief Review

*Archives of Virology*, 1984, **82**, 1-18



29. HUISMANS, H., ERASMUS, B. J.  
Identification of the sérotype-specific and group-specific antigens of Bluetongue Virus  
*Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1981, **48**, 51-58
30. JEGGO, M. H., WARDLEY, R. C., TAYLOR, W. P.  
Role of neutralizing antibody in passive immunity to bluetongue infection  
*Research in Veterinary Science*, 1984, **36**, 81-85
31. STOTT J. L., BARBER T. L., OSBURN B. I.  
Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus  
*Am J Vet Res*, Mai, 1985, **46**, n°5, 1043-1049
32. TAKAMATSU, H., JEGGO, M. H.  
Cultivation of Bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses  
*Immunology*, 1989, **66**, 258-263
33. ANDREW, M., WHITELEY, P., JANARDHANA, V., *et al.*  
Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus  
*Veterinary immunology and immunopathology*, 1995, **47**, 311-322
34. JEGGO, M. H., WARDLEY, R. C., BROWNLIE, J.  
A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques  
*Immunology*, 1984, **52**, 403-410
35. JEGGO, M. H., WARDLEY, R. C.  
Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus type  
*Immunology*, 1982, **45**, 629-635
36. JEGGO, M. H., WARDLEY, R. C.  
Serial inoculation of sheep with two bluetongue virus types  
*Research in Veterinary Science*, 1986, **40**, 386-392

37. GAJDOWA, E., MAYER, V., ORAVEC, C.  
Cross reactive killer T lymphocytes in a flavivirus infection  
*Acta. Virol.*, 1980, **24**, 291-293
38. EFFROS, R. B., DOHERTY, P. C., GERHARD, W., BENNINK, J.  
Generation of both cross-reactive and virus-specific T-cell populations after immunisation  
with serologically distinct influenza A viruses  
*J. exp. Med.*, 1977, **145**, 557-568
39. ROSENTHAL, K. L., ZINKEMAGEL, R. N.  
Cross- reactive cytotoxic T cells to serologically distinct vesicular stomatitis virus,  
*J. Immunol.*, 1980, **124**, 2301-2308
40. HUNTER, P., MODUMO, J.  
A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous protection  
in sheep  
*Onderstepoort J. Vet. Res.*, 2001, **68**, 331-333
41. MURRAY, P. K., EATON, B. T.  
Vaccines for Bluetongue  
*Aust Vet J*, June, 1996, **73**, n°6, 207-210
42. ROY, P., FRENCH, T., ERASMUS, B. J.  
Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease  
*Vaccine*, 1992, **10**, Issue 1, 28-32
43. SAVINI, G., RONCHI, G. F., LEONE, A., *et al.*  
An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in  
Italy  
*j. vetmic.*, 2007, **124**, 140-146
44. ROY, P., URAKAWA, T., VAN DIJK, A. A., ERASMUS, B. J.  
Recombinant virus vaccine for Bluetongue disease in sheep  
*Journal of virology*, Mai, 1990, **64**, n°5, 1998-2003

45. FCO info. (Page consultée le 1<sup>er</sup> novembre 2009), Evaluation des vaccins inactivés contre les BTV 1 et 8 : apport des études en cours et du terrain, [online].  
Adresse URL : <http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article371>
46. PERRIN, A., ALBINA, E., BREARD, E., *et al.*  
Recombinant capripoxvirus expressing proteins of Bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants  
*Vaccine*, 2007, **25**, 6774-6783
47. LOBATO, Z. I. P., COUPAR, B. E. H., GRAY, C. P., *et al.*  
Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens  
*Veterinary immunology and immunopathology*, 1997, **59**, 293-309
48. BOONE, J. D., BALASURIYA, U. B., KARACA, K., *et al.*  
Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep  
*Vaccine*, 2007, **25**, 672-678
49. WADE-EVANS, A. M., ROMERO, C. H., MELLOR, P., *et al.*  
Expression of the major core structural protein (VP7) of Bluetongue Virus, by a recombinant Capripox Virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic Bluetongue virus challenge  
*Virology*, 1996, **220**, 227-231
50. VERMOUT, S., DENIS, M., LOSSON, B., MIGNON, B.  
Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination  
*Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 393-401
51. IBELGAUFTS, H. (Page consultée le 20 mai 2008), Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia, GM-CSF, [online]. Available from World Wide Web :  
<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=GM%2dCSF>

52. CRUCIANI, M., MENGOLI, C., SERPELLONI, G.  
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as an adjuvant for hepatitis B vaccination:  
a meta-analysis  
*Vaccine*, 2007, **25**, n°4, 709-718
53. REALI, E., CANTER, D., ZEYTIN, H.  
Comparative studies of Avipox-GM-CSF versus recombinant GM-CSF protein as immune  
adjuvants with different vaccine platforms  
*Vaccine*, 2005, **23**, 2909-2911
54. YOON, H.A., ALEYAS, A. G., GEORGE, J. A., *et al.*  
Cytokine GM-CSF genetic adjuvant facilitates prophylactic DNA vaccine against  
pseudorabies virus through enhanced immune responses  
*Microbiol. Immunol.*, 2006, **50**, 2, 83-92
55. IBELGAUFTS, H. (Page consultée le 20 mai 2008), Cytokines & Cells Online Pathfinder  
Encyclopaedia, IFN $\alpha$ , [online]. Available from World Wide Web:  
<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IFN%2dalpha>
56. CHENG, G., ZHAO, X., YAN, W.  
Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-  
mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response  
*Vaccine*, 2007, **25**, 5199-5208
57. TOVEY, M. G., LALLEMAND, C., MERITET, J-F., MAURY, F.  
Adjuvant activity of interferon alpha: mechanism(s) of action  
*Vaccine*, 2006, **24**, 46-47.
58. LYONS, A. B  
Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye  
dilution  
*Journal of Immunological Methods*, 2000, **243**, 147-154

59. B. PIGNOLET, B., BOULLIER, S., GELFI, J., *et al.*

Safety and immunogenicity of Myxoma Virus as a new viral vector for small ruminants

*Journal of General Virology*, 2008, **89**, 6, 1371-1379

60. BOZZETTI, M.

Le virus myxomateux vecteur vaccinal chez les petits ruminants : réponse immunitaire et devenir du virus

Th : Med.vet. : Toulouse : 2007; 4060. 94 p

61. C. EL GARCH, H., MINKE J.M., REHDER J., *et al.*

A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse

*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, **123**, 230-239

62. JEGGO, M. H., GUMM, I. D., TAYLOR, W. P.

Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types

*Research in Veterinary Science*, 1983, **34**, 205-211

63. JEGGO, M. H., WARDLEY, R. C., TAYLOR, W. P.

Clinical and serological outcome following the simultaneous inoculation of three bluetongue virus type into sheep

*Research in Veterinary Science*, 1984, **37**, 368-370

64. JANARDHANA, V., ANDREW, M. E., LOBATO, Z. I. P., COUPAR, B. E. H.

The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus

*Research in Veterinary Science*, 1999, **67**, 213-221



# ANNEXES

## Annexe 1 : L'utilisation de cytokines adjuvantes

Le rôle de l'adjuvant est très important en ce qui concerne la vaccination contre la FCO. En effet, l'équipe de Roy a montré en 1992 que la réponse immunitaire obtenue après vaccination à l'aide d'un vaccin recombinant Baculovirus-VLP est bien meilleure en présence d'adjuvant. Les adjuvants présentent la capacité de stimuler l'immunité humorale et cellulaire (Roy *et al.*, 1992 - 42). On suppose également qu'ils modifient les antigènes en changeant leur conformation ou en altérant leur distribution des charges.

L'effet adjuvant des cytokines est bien connu et il a même été testé, ainsi que certains de leurs inhibiteurs. De nombreuses recherches concernant les cytokines se focalisent actuellement sur une cible essentielle que constitue la cellule dendritique. Ces cellules d'origine médullaire sont des CPA professionnelles qui agissent sous l'effet des premiers signaux inflammatoires ; ce sont elles qui *in fine* font le lien entre l'immunité innée et la réponse adaptative spécifique. Les IFN de type I, parmi lesquels l'IFN $\alpha$ , activent les cellules dendritiques et délivrent des signaux qui permettent l'activation des cellules T. Ils amplifient à la fois la réponse cytotoxique et la réponse humorale, et constituent des adjuvants potentiellement très efficaces contre les infections virales. Le GM-CSF stimule également la réponse cellulaire et cytotoxique (Vermout *et al.*, 2003 - 50).

- GM-CSF (Ibelgaufts, 2008 - 51)

Les facteurs CSF, appartiennent au groupe des protéines et peptides de la régulation, plus connues sous le nom de cytokines. Les CSF sont produits par différents types de cellules. Ces facteurs sont nécessaires à la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Le facteur GM-CSF qui représente 90 % de la totalité de l'activité des CSF, est une protéine sécrétée par les granulocytes, les LT plus précisément, et les macrophages suite à l'activation des cellules par les antigènes et les mitogènes (facteurs qui induisent la division des cellules). GM-CSF agit en synergie avec d'autres cytokines.

Récemment, son utilisation en tant qu'adjuvant a été évaluée dans les vaccins en raison de sa capacité à agir localement en stimulant la prolifération et la maturation des CPA, à savoir les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques présentes au site d'injection. Il agit donc comme un stimulant de l'immunité lorsqu'il est administré avec une préparation vaccinale. Les propriétés du GM-CSF en tant qu'adjuvant vaccinal reposent sur la variété de ses actions sur le système immunitaire, et notamment l'activation des macrophages, l'augmentation de l'expression des antigène du CMH II, la stimulation de la maturation et de la migration des cellules, l'amélioration de la mémoire immunitaire au travers de la stimulation des LB et LT, et l'induction d'une inflammation localisée au site d'injection (Cruciani *et al.*, 2007 - 52). L'injection de GM-CSF augmente le nombre de cellules dendritiques activées dans les nœuds lymphatiques régionaux, ce qui permet d'amplifier les réponses immunitaires cellulaire et humorale à la suite de la vaccination. Par ailleurs, elle augmente la réponse cytotoxique CD8 qui est mise en évidence par la détection de la production d'IFN $\gamma$  par les LT (Real *et al.*, 2005 - 53). Enfin, GM-CSF oriente plutôt la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire.

Dans l'étude de Yoon en 2006, l'effet adjuvant du GM-CSF dans un vaccin utilisant la glycoprotéine B du PrV a été étudié dans un modèle murin. La co-injection de l'ADN codant le GM-CSF augmente le taux d'Ig G spécifiques. Lors d'un challenge avec une dose létale de PrV, les animaux ayant reçu la co-injection de GM-CSF, résistent mieux à l'infection. Ainsi, la co-administration d'un vecteur exprimant GM-CSF augmente l'immunité protectrice, cellulaire et humorale, contre l'infection PrV (Yoon *et al.*, 2006 - 54).

Cruciani et son équipe ont confirmé l'efficacité du GM-CSF pour augmenter la réponse immunitaire à la vaccination contre le virus de l'hépatite B. En effet, GM-CSF provoque une séroconversion plus précoce, en réponse au vaccin dans la totalité des populations étudiées (Cruciani *et al.*, 2007 - 52).

- IFN $\alpha$  (Ibelgaufits, 2008 - 55)

Les IFN sont des protéines multifonctionnelles présentant chacune une activité biologique très spécifique. Par définition, les IFN sont des protéines qui provoquent une activité antivirale non spécifique, tout du moins dans les cellules homologues. Les IFN possèdent également des propriétés antiprolifératives et immunomodulatrices ; ils influencent le métabolisme, la croissance et la différenciation des cellules.

Ces substances sont synthétisées à la suite de l'activation du système immunitaire. IFN $\alpha$  est produit par les monocytes/macrophages, les cellules lymphoblastiques, les fibroblastes et un grand nombre d'autres cellules après infection virale.

Les IFN sont bien connus pour leur activité antivirale contre un large spectre de virus. L'attachement de l'IFN à son récepteur induit la synthèse de nombreuses protéines qui sont les médiateurs de l'activité antivirale. Les IFN $\alpha$  jouent également un rôle immunomodulateur et possèdent une activité antiproliférative.

Dans une étude concernant la vaccination contre la fièvre aphteuse (FA) réalisée chez le porc, IFN $\alpha$  utilisé comme adjuvant dans un vaccin sous-unitaire, est capable d'induire la production de cytokines inflammatoires *in vivo*. En outre, l'IFN $\alpha$  polarise la réponse immunitaire vers une réponse de type 1. Par ailleurs, IFN $\alpha$ , en synergie avec la protéine recombinante du vaccin a induit la production d'IFN endogène. Suite à un challenge avec le *Foot-and-mouth disease virus* [FMDV] (virus de la fièvre aphteuse ou virus aphteux), les animaux ainsi vaccinés sont protégés contre l'infection et synthétisent des anticorps contre la protéine non structurale utilisée dans le vaccin. IFN $\alpha$  apparaît donc comme un adjuvant efficace pour ce type de vaccin recombinant (Cheng G. *et al.*, 2007 - 56).

L'IFN $\alpha$  produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (plasmacytoid dendritic cell ou pDC) est un puissant activateur des cellules B polyclonales ; il induit une forte réponse humorale précoce, caractérisée par un changement d'isotypes et la protection contre l'infection. Ce facteur induit la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'anticorps. IFN $\alpha$  est un adjuvant très actif lorsqu'il est injecté par voie intramusculaire à des souris en association avec le vaccin Vaxigrip<sup>ND</sup> (combinant deux souches de FLUAV et une souche FLUBV). En effet, des souris, qui ont été immunisées avec ce vaccin contenant de l'IFN $\alpha$ , ont des taux plus élevés d'anticorps spécifiques du virus, que les souris vaccinées avec le vaccin seul. IFN $\alpha$  agit notamment sur la présentation antigénique au site de l'administration du vaccin (Tovey *et al.*, 2006 - 57).



## **Annexe 2 : Protocole expérimental du test de prolifération lymphocytaire**

### *a. Isolement des PBMC sur gradient de Ficoll*

L'isolement sur gradient de Ficoll des cellules mononuclées repose sur les densités respectives des cellules et du Ficoll qui est un polymère du saccharose. Après centrifugation, les cellules mononuclées se rassemblent en un anneau opalescent à la surface du Ficoll.

#### *A température ambiante (TA):*

- Prélèvement de 20 ml de sang sur tubes EDTA.
- Dilution au demi de la totalité du sang dans une solution saline équilibrée de Hank (Hank's balanced salt solution ou HBSS).
- Dépôt du sang dilué sur le Ficoll : rapport Ficoll/sang dilué au demi = 1/3 - 2/3.
- Centrifugation 20 minutes, à 1200 g.
- Récupération des PBMC.
- Lavage des PBMC dans 50 ml de HBSS.

#### *A 4 °C :*

- Centrifugation à 400 g, 4 °C, 10 minutes.
- Hémolyse des globules rouges avec 3 ml d'ACK (acétate de potassium) pendant 3 minutes.
- Ajout du HBSS jusqu'à 50 ml pour neutraliser l'action de l'ACK.
- Filtration (avec un filtre nylon 40 micromètres ou  $\mu\text{m}$ ) afin d'éliminer les cellules agrégées.
- Centrifugation 10 minutes à 4 °C à 300 g puis reprise des cellules dans 20 ml de HBSS.
- Dénombrement des cellules à l'aide d'une cellule de Thoma ( $n/16 \times 2,5 \times 10^5$ ).
- Retrait du surnageant et reprise des cellules dans un volume de HBSS de façon à ajuster la concentration cellulaire à  $10^7$  cellules/ml.
- Distribution en plaque (volume final : 3 ml par puits soit  $3 \cdot 10^7$  cellules par puits).

### *b. Marquage des cellules au CFSE*

- Préparation à l'obscurité du CFSE 2X à 2,5 micromolaires ( $\mu\text{M}$ ).
- Ajout volume à volume de la solution de CFSE à 2,5  $\mu\text{M}$  sur les cellules dans un tube Falcon 15 ml en agitant doucement. La concentration finale de CFSE est ainsi de 1,25  $\mu\text{M}$ .
- Incubation sous la hotte de culture pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière.
- Ajout volume à volume de SVF (sérum de veau fœtal) pour neutraliser le marquage CFSE pendant 3 minutes, à l'abri de la lumière, puis compléter le tube jusqu'à 50 ml avec du milieu complet du Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute medium complet ou RPMIc) filtré à 0,2  $\mu\text{m}$ . Ce milieu contient 10 % SVF, 1 % P/S (pénicilline / streptomycine), 1 % acides aminés non essentiels, 1 % sodium pyruvate, 0,1 %  $\beta$ mercapto-éthanol.
- Centrifugation à 300 g, 4 °C, 10 minutes.
- Lavage dans un nouveau tube pour éliminer l'excès de CFSE et ajustement de la concentration à  $6 \cdot 10^6$  cellules/ml avec du RPMIc.

### *c. Mise en culture des cellules dans des plaques de culture 24 puits*

- Dépôt de 500 microlitres ( $\mu\text{l}$ ) des suspensions cellulaires ( $3 \cdot 10^6$  cellules/ml), marquées au CFSE ou non (contrôle) dans chaque puits.
- Ajout dans les puits de 500  $\mu\text{l}$  de ConA, de milieu seul ou de RPMIc contenant les virus à un rapport virus/cellule (multiplicity of infection ou MOI) = 1 =  $6 \cdot 10^6$  ufp/ml.
- Culture pendant 6 jours à 37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ .

*d. Marquage fluorescent pour l'analyse en cytométrie en flux*

- Collecte des cellules
  - Collecte des cellules en tube pour tri cellulaire à partir de la fluorescence (fluorescence-activated cell sorting BD ou FACS BD) 5 ml.
  - Centrifugation 5 minutes à 4 °C à 400 g, retrait du surnageant et reprise des cellules dans 200 µl de tampon tampon phosphate salin (phosphate buffered saline ou PBS), 0,5 % d'albumine sérique bovine (bovine serum albumine ou BSA), 2,5 millimolaire (mM) EDTA (= Tampon de marquage et de lavage).
  - Transfert des 200 µl de cellules dans une plaque de culture 96 puits.
  - Centrifugation 5 minutes à 4 °C, à 400 g et retrait du surnageant par retournement.
  
- Double marquage des cellules en culture FACS
  - Préparation d'un mélange d'anticorps contenant des anticorps anti-CD2 phycoérythrine (PE) (1 :500) et des anticorps anti-CD4 Alexa 647 (1 :1000) dans du tampon FACS.
  - Ajout de 50 µl du mélange d'anticorps par puits et incubation à 4 °C à l'obscurité pendant 20 minutes.
  
- Lavage des cellules
  - Ajout de 100 µl de tampon FACS dans chaque puits.
  - Centrifugation 5 minutes, à 400 g, 4 °C, puis retrait du surnageant par retournement.
  - Ajout de 200 µl de tampon FACS dans chaque puits.
  - Centrifugation 5 minutes, à 400 g, 4 °C, puis retrait du surnageant par retournement.

*e. Analyse par cytométrie en flux*

Après remise en suspension des cellules sous 200 µl de tampon FACS, celles-ci sont transférées en microtubes et analysées à l'aide d'un cytomètre en flux (FACScalibur, BD Biosciences).

### Annexe 3 : Protocole expérimental de détection des LT CD8 spécifiques

#### a. Isolement des PBMC (cf. Annexe 2. a.)

#### b. Stimulation des cellules

- Remise en suspension des cellules, ajustement de la concentration à  $5 \cdot 10^6$  cellules/ml avec du RPMIc 10 % de sérum bovin fœtal (fœtal bovine serum ou FBS) et distribution de 1 ml par tube FACS.
- Centrifugation des cellules à 500 g pendant 5 minutes puis retrait du surnageant.
- Mise en suspension des cellules dans 100 à 200  $\mu$ l RPMIc 10 % FBS en agitant doucement.
- Infection des cellules avec le virus SG33 à une MOI=3. Nous avons gardé un tube de cellules non stimulées comme contrôle et un tube de cellules avec ConA à 1  $\mu$ g/ml.
- Incubation des cellules pendant 2 heures à 37 °C.
- Ajout de 1 ml du milieu RPMIc 10 % FBS et incubation pendant 5-6 heures.
- Ajout de la Monensine à 2  $\mu$ M dans chaque tube et agitation.
- Incubation pendant 3 heures.

#### c. Marquage cellulaire

Deux groupes de marquage :

- Marquage I :
  - o Surface: CD8-PE anticorps monoclonal isotype IgG2a (MCA 2216 PE) dilué au  $100^{\text{ème}}$ . Il s'agit d'un anticorps de souris anti-CD8 de mouton (Serotec).
  - o Intracellulaire : IFN $\gamma$ -isothiocyanate de fluorescéine (fluoresceine isothiocyanate ou FITC) anticorps monoclonal IgG1 (MCA 1783F) dilué au  $500^{\text{ème}}$ . Il s'agit d'anticorps de souris anti-IFN $\gamma$  de bovin (Serotec).
  
- Marquage II :
  - o Surface cellulaire :
    - CD11a FITC anticorps monoclonal IgG2a (MCA 2217) dilué au  $500^{\text{ème}}$ . Il s'agit d'un anticorps de souris anti-CD11a de mouton (Serotec).
    - CD8-PE anticorps monoclonal isotype IgG2a (MCA 2216 PE) dilué au  $100^{\text{ème}}$ . Il s'agit d'un anticorps de souris anti-CD8 de mouton (Serotec).
  - o Intracellulaire :
    - IFN $\gamma$  biotinylé dilué au  $500^{\text{ème}}$ .
    - Streptavidine-allophycocyanine (APC) (8430-0054) (Serotec).
  
- Marquage I

- Récolte des cellules.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis retrait du surnageant.
- Ajout d'anticorps anti-CD8-PE dans le tampon FACS.
- Incubation 30 minutes au réfrigérateur.
- Lavage des cellules avec du PBS.
- Ajout de 1ml de paraformaldéhyde (PFA) 4 % par tube.
- Incubation 15 minutes à 37 °C.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis retrait du surnageant.
- Ajout de 1 ml d'une solution de perméabilisation PBS/Triton X100 0,5 %.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis élimination du surnageant.
- Ajout de 1mL de la solution de perméabilisation.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis retrait du surnageant.
- Ajout d'anticorps anti-IFN $\gamma$ -FITC dans du tampon FACS.
- Incubation 30 minutes au réfrigérateur.

- Lavage deux fois avec la solution de perméabilisation.
- Reprise dans 400 µl de PBS.

- Marquage II

- Ajout d'anticorps anti-CD8-PE et anti-CD11a-FITC dans tampon FACS.
- Incubation 30 minutes au réfrigérateur.
- Lavage des cellules au PBS.
- Ajout de 1 ml de PFA 4 % par tube.
- Incubation 15 minutes à 37 °C.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis retrait du surnageant.
- Ajout de 1mL d'une solution de perméabilisation PBS/Triton X100 0,5 %.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis retrait du surnageant.
- Ajout de 1mL de la solution de perméabilisation.
- Centrifugation des cellules à 300 g, 4 °C pendant 10 minutes puis retrait du surnageant.
- Ajout d'anticorps anti-marqueur intracellulaire IFN $\gamma$  dans du tampon FACS.
- Incubation une nuit à 4 °C.
- Ajout de Streptavidine-APC dans du tampon FACS.
- Lavage dans Triton X100 (1 ml par tube) deux fois.
- Reprise dans 400 µl de Triton X100.

*d. Analyse FACS (cytométrie en flux)*

Après remise en suspension des cellules sous 100 µl de tampon FACS, celles-ci sont transférées en microtubes et analysées au cytomètre en flux. Nous avons acquis 400 - 500 000 événements. La sécrétion d'IFN $\gamma$  qui active les LT CD8 a ainsi pu être mise en évidence et par extension, nous avons pu étudier la prolifération des LT CD8 en fonction de l'immunisation reçue par les moutons.

#### **Annexe 4 : Protocole expérimental du test ELISA indirect**

On utilise des plaques de 96 puits (50 µl/puits) qui sont sensibilisées et sur lesquelles on teste les différents sérums à différentes dilutions.

- Une partie des puits des microplaques est tapissée avec le virus recombiné SG33-VP7 dilué au 100<sup>ème</sup> dans un tampon PBS-Tween-BSA ; la quantité distribuée par puits est de 3 µl sous 300 µl de tampon. La deuxième partie des cupules est tapissée avec la protéine VP7 dilué au 50<sup>ème</sup> dans un tampon PBS-Tween-BSA ; la quantité distribuée par puits est de 3 µl sous 300 µl de tampon.
- Les plaques sont recouvertes avec un couvercle autocollant et stockées à 4 °C pendant une nuit.
- Après la nuit d'incubation, la plaque est vidée par retournement et lavée 3 fois avec du PBS-Tween 0,1 %.
- Ajout de 100 µL par puits des dilutions des sérums à tester
- Incubation à l'étuve pendant 1 heure à 37 °C.
- Lavage des plaques avec du PBS-Tween 0,1 %.
- Ajout des anticorps d'âne anti-IgG de mouton dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween-BSA 1 % (100 µl par puits).
- Incubation à 37 °C pendant 1 heure.
- Lavage des plaques avec du PBS-Tween 0,1 %.
- Ajout du substrat de POD : le TMB dilué au 20<sup>ème</sup> en tampon citrate (100 µl par puits). Le TMB oxydé par la POD donne un chromophore de couleur bleue ; la coloration bleue indique la présence d'anticorps anti-SG33-VP7. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-SG33-VP7 ; cette méthode permet donc un dosage par colorimétrie.
- Révélation à l'abri de la lumière 10-15 minutes.
- Arrêt de la réaction par ajout de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>1N (100 µl par puits). Le chromophore devient alors jaune.
- La lecture est effectuée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450-650 nm.

## Annexe 5 : Protocole expérimental du test de séroneutralisation

Les sérums sont décomplémentés dans cette expérience.

- Séroneutralisation du vecteur vaccinal SG33

- Dilution des sérums décomplémentés dans 300 µl de milieu minimum essentiel de Eagle modifié Dubelco/vogt (Dulbecco's modified Eagle's medium ou DMEM) 1 % PS dans des microtubes  
Pour les sérums à tester : dilution au demi de deux en deux jusqu'au 1/32<sup>ème</sup> sur cinq puits. Pour les témoins négatifs (sérums à J0) : dilution au 1/6<sup>ème</sup> de deux en deux. Pour les témoins positifs: dilution à partir de 1/250<sup>ème</sup>.

- Ajout de 150 ufp de virus SG33 par puits.
- Incubation 1 heure à 37 °C (formation des complexes virus-anticorps).
- Incubation toute la nuit à 4 °C pour augmenter l'affinité des complexes virus-anticorps.
- Ajout du mélange sérum + virus sur le tapis cellulaire : 100 µl par puits.
- Incubation 2 heures à 37 °C.
- Retrait du surnageant (mélange sérum + virus).
- Ajout de 100 µL de DMEM 1 % PS / 5 % SVF.
- Observation de l'ECP.

- Séroneutralisation du BTV 2

Le protocole est sensiblement le même que pour la séroneutralisation du vecteur vaccinal à quelques exceptions près :

- La concentration en virus utilisée est seulement de 50 ufp.
- Les dilutions se font dans du DMEM 1 % sans antibiotiques
- La première incubation à 37 °C dure 1 heure et 30 minutes.
- L'incubation à 4 °C pendant la nuit est inutile.

## **Annexe 6 : Protocole expérimental du test ELISA par compétition de liaison**

- Homogénéisation des tous les réactifs par retournement à TA (21 °C +/- 5 °C).
- Distribution de 50 µl de diluant 2 dans chaque puits.
- Ajout de 50 µl de contrôle positif dans deux puits, 50 µl de contrôle négatif dans deux autres puits et 50 µL de chaque échantillon de sérum à tester dans les puits restants.
- Incubation 45 minutes +/- 4 minutes à TA.
- Préparation du conjugué anti-VP7-POD 1X en diluant le conjugué anti-VP7-POD 10X au 1/10<sup>ème</sup> en tampon de dilution 2.
- Sans vider, ni laver la plaque, distribution de 100 µl de conjugué anti-VP7-POD 1X dans chaque puits.
- Incubation 30 minutes +/- 3 minutes à TA.
- Lavage trois fois de chaque puits avec environ 300 µl de solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Distribution de 100 µl de solution de révélation dans chaque puits.
- Incubation 15 minutes +/- 2 minutes à TA à l'obscurité.
- Distribution de 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits pour arrêter la réaction.
- Mesure et enregistrement des densités optiques à 450 nm.

## **Annexe 7 : Protocole expérimental de la PCR quantitative (kit Taqvet all genotypes, LSI<sup>ND</sup>, Lissieu, France)**

- Extraction de l'ARN en plaque (kit Macherey Nagel, Düren, Germany Nucleospin 8/96)
  - Sous un poste de sécurité microbiologique : dépôt de 100 µl de sang dans chaque puits d'un MN Round-Well-Block. Dépôt de 100 µl d'eau pour les témoins négatifs.
  - Ajout de 400 µl de tampon RAV1 et de 20 µl de protéinase K dans chaque puits.
  - Mélange (en pipetant plusieurs fois).
  - Fermeture du MN Round-Well-Block avec des bouchons.
  - Incubation du MN Round-Well-Block à 70 °C pendant 10 minutes.
  - Répartition de 400 µl d'éthanol 100° dans une plaque MN Square-Well-Block.
  - Retrait des bouchons et transfert de la totalité de chaque puits dans la plaque MN Square-Well-Block contenant l'éthanol 100°.
  - Mélange (en pipetant plusieurs fois).
  - Placement d'une plaque Nucleospin Virus Binding Strip sur un MN Square-Well-Block et transfert de la totalité des échantillons dans la plaque Nucleospin Virus Binding Strip.
  - Recouvrement de la plaque Nucleospin Virus Binding Strip à l'aide d'un film.
  - Centrifugation 2 minutes à 5600 g.
  - Retrait du film et ajout de 500 µl de tampon RAW (tampon de lavage) dans chaque puits de la plaque.
  - Recouvrement de la plaque à l'aide d'un film et centrifugation 2 minutes à 5600 g.
  - Placement de la plaque sur un nouveau MN Square-Well-Block.
  - Ajout de 700 µl de tampon RAV3 (tampon de lavage) dans chaque puits de la plaque.
  - Recouvrement de la plaque à l'aide d'un film et centrifugation 2 minutes à 5600 g.
  - Retrait du film et placement de la plaque sur le MN Square-Well-Block.
  - Ajout de 700 µl de tampon RAV3 (tampon de lavage) dans chaque puits de la plaque.
  - Recouvrement de la plaque à l'aide d'un film et centrifugation 15 minutes à 5600 g (Élimination des traces du tampon RAV3).
  - Placement de la plaque Nucleospin Virus Binding Strip sur une élution rack avec MN Tube Strips.
  - Distribution de 80 µl d'eau préchauffée à 70 °C dans chaque puits de la plaque Nucleospin Virus Binding Strip.
  - Incubation 1-2 minutes à TA.
  - Recouvrement de la plaque à l'aide d'un film et centrifugation 2 minutes à 5600 g.
  - Retrait de la plaque Nucleospin Virus Binding Strip et fermeture des tubes avec des bouchons.
  - Conservation des ARN élués à 4 °C pour une utilisation dans les 24 heures.
  
- Dénaturation des ARN viraux
  - Distribuer dans une plaque 96 puits 1 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 10 µl de chaque ARN par puits.
  - Fermeture des puits avec les barrettes des bouchons de tailles correspondantes.
  - Centrifugation de la plaque.
  - Chauffage de la plaque pendant 3 minutes à 95 °C dans le thermocycleur puis conservation de la plaque à 4 °C jusqu'à utilisation (tout de suite).
  
- Amplification sur un thermocycleur ABI. Les résultats ont été analysés à l'aide du SDSsoftware v1.2.



Toulouse, 2009

NOM : CARUSO

Prénom : Agathe

TITRE : Evaluation de la protéine VP7 pour la protection des ovins vis-à-vis du virus Bluetongue (BTV) lors d'un essai vaccinal utilisant le vecteur Poxvirus SG33.

RESUME : L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel vaccinal d'un vecteur Poxvirus exprimant l'antigène recombinant VP7 du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO).

La première partie du mémoire présente le contexte de l'étude et une synthèse bibliographique sur les modalités vaccinales, en particulier les nouvelles approches à l'aide de vaccins vectorisés. En outre, le document décrit avec précision l'état des connaissances sur la réponse immunitaire contre le virus Bluetongue (BTV) et justifie le choix de l'antigène recombinant intégré au vecteur.

La deuxième partie, consacrée au travail expérimental présente tout d'abord les méthodes employées pour analyser la réponse vaccinale, et les résultats obtenus lors d'une épreuve virulente. L'originalité de cette étude réside non seulement dans l'approche utilisée pour vacciner les animaux, mais aussi dans l'analyse de la réponse immunitaire. En conséquence, ce travail démontre que le vecteur Poxvirus utilisé a la capacité d'induire une réponse humorale et cellulaire dans l'espèce ovine. Cependant, l'antigène recombinant qui a été utilisé ne permet pas la protection vis-à-vis de l'agent de la bluetongue contrairement aux conclusions d'une étude publiée antérieurement. Ces résultats ont depuis été confirmés par plusieurs autres équipes.

MOTS-CLES : virus Bluetongue, fièvre catarrhale ovine, VP7, *Leporipoxvirus*, vaccination, ovins

---

ENGLISH TITLE : Evaluation of VP7 protein as a candidate antigen for protection against *Bluetongue virus* (BTV) in a vaccinal approach using Poxvirus vector SG33.

ABSTRACT : This study aimed at assessing the vaccination potential of a Poxvirus vector expressing recombinant *Bluetongue virus* VP7 antigen.

The first part of the dissertation presents the study context and a bibliographic synthesis about vaccination and new approaches using vector vaccines. Besides, the document precisely describes current knowledge about the immune response to *Bluetongue virus* (BTV), and justifies the use of VP7 as the recombinant antigen.

The second part, devoted to the experimentation, first presents methods used to analyse immune response to vaccination, then the challenge results. The study originality lies not only in vaccination approach but also in immune response analysis. As a consequence, this work proves that the Poxvirus vector used in this study is able to induce serological and cellular responses in sheep. Nevertheless, VP7 as a recombinant antigen doesn't provide any protection against *Bluetongue virus* in opposition to conclusions of a previously published work. From that time other teams have corroborated these results.

KEYWORDS : *Bluetongue virus*, bluetongue, VP7, *Leporipoxvirus*, vaccination, sheep