



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 4190

To cite this version :

DELAMARE, Marie. *Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire induite par les vaccins recombinants T1-M2e-M022L et T1-M071L-M2e dans un modèle souris*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 112 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire induite par les vaccins recombinants T1-M2e-M022L et T1-M071L-M2e dans un modèle souris

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse*

par

Marie Alice Thérèse DELAMARE

Née le 31 juillet 1986 à Mont-Saint-Aignan (Seine-Maritime)

Directeur de thèse : Mme. le Docteur Séverine BOULLIER

JURY

PRESIDENT :
M. Pasquier Christophe

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme. Boullier Séverine
Mme. Camus Christelle

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche ECOLE NATIONALE VETERINAIRE 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. PAVAUX	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. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, 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*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
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*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
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. **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*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENT CONTRACTUEL

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORRAND Leni**, *Médecine Interne*
Mlle **DEBREUQUE Maud**, *Médecine Interne*
M **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Médecine*
M. **LE BOEDEC Kevin**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Monsieur Pasquier Christophe

De la faculté de Médecine de Toulouse

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

Hommage respectueux.

A Madame Boullier Séverine

De l'Ecole Nationale de médecine de Toulouse

Qui a accepté de m'encadrer dans ce travail de thèse. Pour sa patience et ses conseils.

Sincères remerciements

A Madame Camus

Qui a accepté d'être l'assesseur de ce travail.

Hommage respectueux

A l'ensemble du personnel du service de microbiologie

Pour leur accueil et leur aide.

A mes Parents, pour tout ce qu'ils nous ont transmis, pour avoir cru en moi et surtout pour m'avoir soutenue dans tout mes projets, même ceux désespérés (ne citons pas le violon).

A mon grand frère Matthieu, pour avoir toujours su resté présent, même expatrié aux quatre coins du monde. Malgré ton côté peu expansif je sais que je peux toujours compter sur toi.

A ma petite sœur Manon, pour ses bon quart d'heure et sa foutue humeur (non non je n'ai inversée l'expression par erreur)...et ses délicieux macarons qui nous font lui pardonner presque tout.

A Mamour, pour tout ce que tu as fait et fais encore pour nous. Bon d'accord tu nous potine un peu parfois, et je ne suis pas la plus têtue des deux, mais c'est aussi pour ça qu'on t'aime.

A Papi, pour ta patience quand il fallait me conduire chez une copine dont je n'avais pas l'adresse, pour les pièces jaunes transformées en bonbon à la sortie de l'école, pour les journées pêche, les gâteaux dans le four, et tout ces petits moments que les mots ne peuvent décrire mais que je garde en souvenir.

A Arnaud, pour ce qu'on vit depuis quatre ans et demi, pour supporter mes petits caprices, pour toutes les blagues nulles que tu t'évertues à sortir et sans lesquelles tu n'aurais pas autant de charme, et pour m'avoir fait découvrir (et apprécier) le Nord.

A Agnès, pour ton amitié inébranlable. Il paraît qu'on peut juger quelqu'un à la valeur de ses amis et je suis fière d'être la tienne. Même si nos petits cafés ont tendance à s'espacer j'espère qu'ils dureront. Vivement qu'on sabre à nouveau le champagne en regardant le soleil se coucher sur la mer.

A Virginie et Marie So, pour nos soirées pizza/Ferrero/Smallville (eh oui on est passé par là), pour m'avoir transmis le goût des déguisements improbables, pour cette semaine inoubliable à la Baule, pour cette péniche « pseudo boîte » qu'on aimerait oublier, pour avoir réussi à me faire abandonner les Buffalo, pour les bals de l'Elisée Montmartre et tous nos futurs we.

A Elodie, pour ta joie de vivre, pour m'avoir fait accepter que le Lot est une jolie région (un peu pommée quand même), pour m'avoir fait découvrir le festival des pêcheurs de thon, les aubaines et le pastis, pour avoir été ma meilleure partenaire de boom, et parce qu'avec toi je me sens un peu moins boulette. *A MH*, pour ton dynamisme et ton accent qui revient au galop quand il faut se mettre aux abris. Pour ta cascade en voiture devant le RU, pour nous avoir fait découvrir les plus beaux coins de Corse, ses meilleures spécialités culinaires, son fameux cheptel, et surtout ses cochons sauvages nourris aux canestrellis. *A toutes les deux* pour tous nos délires, nos voyages, et j'espère qu'on continuera à crapahuter à travers le monde ensemble.

A Kevin, pour être unique en ton genre, complètement décalé, voir un brin cynique. Pour m'avoir prouvé que le AD ce n'est pas si mauvais qu'on le prétend. Pour ta passion de la faune sauvage que grand merci tu ne m'a pas transmis, même si j'ai su apprécier avec toi la douce voix de Arsenic.

A Hélène, pour ta gentillesse, pour avoir ouvert ta porte et ton frigo à une SDF (et son chien tout boueux) tête de linotte qui avait encore une fois perdu ses clés, pour tes délicates attentions de pâques. Pour tes soirées théologiques source de nombreux débats, de petites provocations mais aussi d'ouverture d'esprit. J'espère que tu trouveras la réponse à tes questions.

A Maryvonne et Lofti, pour les apéros qui commencent à 18h30, pour les parties de Buzz auxquelles je suis décidément nulle et celles de Dragon ball Z qui sont tellement drôles à regarder (pour trouver les mauvais joueurs suivez mon regard), pour les week-ends à Falaises et d'ailleurs vivement le prochain.

A Cyril et Audrey, pour nos apéros, nos sorties de chien, pour votre accueil et surtout pour m'avoir permis d'être sûre que je déteste les piafs.

A Nico, pour les pauses café, pour m'avoir fait découvrir la découverte le Mont d'Or fondue sur les saucisses de Morteau... Et bien le bonjour à Cyndi.

A Sylvain, pour avoir été mon partenaire de piscine, pour ce diplôme de biologie marine durement préparé mais malheureusement jamais validé, et pour les souvenirs de boom.

A mes co-AH, grâce à qui j'ai passée une année merveilleuse. *Nadine*, pour tes réflexions poétique à tout moment de la journée (y compris et surtout à table), pour nos pauses clope au soleil où il manquait décidément une piscine, et pour ton amour sans borne pour les vers. *Baka*, pour ton caractère affirmé, pour ton soutien sur le dance floor, pour ta pink attitude et tes « journées fille » (au faite elles sont sympa tes nouvelles chaussures tu les achetées quand ?) *Sherka*, pour avoir mit une touche de sérénité au milieu de tant d'effervescence, pour tes siestes, et pour tes réflexions rares mais toujours pertinentes en staff.

A tous les membres de la MAE, parmi lesquels j'ai passé une année très agréable et grâce à qui j'ai énormément appris. Il n'est pas toujours facile d'arriver dans une nouvelle ville, merci de m'avoir aussi rapidement et aussi facilement intégré dans votre équipe. *Nora*, merci pour ta gentillesse, ta gestion maternelle de notre équipe, pour ton encadrement et pour nous avoir transmit ton goût de l'échographie, *Seb*, pour ton côté faux méchant, tes brefs coups de gueule, et ton accent du sud qui m'a permis de ne pas être complètement dépaycé, *Raf*, pour ton esprit critique qui nous pousse à nous poser les bonnes questions... et a y répondre, *Alain*, pour nous rappeler que certaines maladies qu'on a tendance à laisser de côté existaient encore il n'y a pas si longtemps que ça, et pour avoir démystifier certain "acte de guerre" tels que les amputations d'onglon et les péricardiocentèses.

A Franck, qui par sa patience et sa gentillesse m'a permis de trouver ma voix, et *A tous ceux non cités* mais qui par leur présence m'ont aidé à me construire et à réaliser mes rêves.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	- 14 -
LISTE DES TABLEAUX	- 16 -
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	- 17 -
INTRODUCTION.....	- 19 -
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	- 22 -
1. LES INFLUENZAVIRUS ET LA PROTEINE M2	- 22 -
1.1. Virologie	- 22 -
1.1.1. Classification	- 22 -
1.1.2. Structure et propriétés	- 23 -
1.1.3. Nomenclature.....	- 26 -
1.2. La protéine M2.....	- 29 -
1.2.1. Structure.....	- 29 -
1.2.2. Mécanisme d'activation du canal	- 31 -
1.2.3. Rôle de la protéine M2	- 32 -
2. LES ENJEUX ACTUELS DES INFLUENZAS AVIAIRES	- 33 -
2.1. Petite histoire des « Pestes aviaires » et découverte des influenza virus	- 33 -
2.2. Rôle des mutations dans l'émergence d'épidémie ou de pandémie et relation entre les virus aviaires, humains et porcin	- 35 -
2.2.1. Les glissements antigéniques	- 35 -
2.2.2. Les cassures antigéniques.....	- 37 -
2.3. L'importance des influenza virus en termes de santé publique ..	- 41 -

3. QUELQUES RAPPELS D'IMMUNOLOGIE.....	- 43 -
3.1. L'immunité anti-influenza.....	- 43 -
3.1.1. Rappel du cycle des influenza virus	- 43 -
3.1.2. La réponse immunitaire anti-influenza	- 46 -
3.1.2.1. La réponse immunitaire non spécifique.....	- 46 -
3.1.2.2. La réponse immunitaire spécifique.....	- 49 -
3.1.2.3. Etude bibliographique de l'immunité induite par M2.....	- 52 -
3.2. La vaccination	- 57 -
3.2.1. Principes de bases de la vaccination	- 57 -
3.2.2. Les différents types de vaccins.....	- 59 -
4. LE VIRUS MYXOMATEUX : UN VECTEUR VACCINAL ?.....	- 63 -
4.1. Présentation générale du virus myxomateux	- 63 -
4.1.1. Classification	- 63 -
4.1.2. Structure.....	- 64 -
4.1.3. Le cycle viral	- 66 -
4.2. Utilisation des poxvirus pour la vaccination en espèce aviaire....	- 67 -
 CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE	 - 69 -
1. MATERIEL ET METHODES	- 69 -
1.1. Vaccins et souris utilisées	- 69 -
1.2. Préparation des splénocytes	- 70 -
1.2.1. Prélèvement des rates	- 70 -
1.2.2. Purification des splénocytes	- 70 -
1.2.3. Mise en culture des cellules.....	- 71 -
1.2.3.1. Stimulation pour le marquage intracellulaire.....	- 71 -
1.2.3.2. Stimulation pour les ELISA.....	- 71 -
1.2.3.3. Marquage et stimulation pour le CFSE.....	- 72 -
1.2.4. Marquage intracellulaire	- 73 -
1.2.5. Tests ELISA.....	- 74 -
1.2.5.1. Test ELISA IL2.....	- 74 -
1.2.5.2. Test ELISA Interféron gamma.....	- 75 -

2. RESULTATS	- 77 -
2.1. Les vaccins M022 et M071 ne protège pas contre le virus PR8...-	77 -
2.2. Les vaccins recombinants n'induisent pas la présence de lymphocytes T spécifique du M2.....-	79 -
2.3. La vaccination MO22 ou M071 n'induit pas la sécrétion significative de cytokines in vitro.....-	84 -
2.4. La vaccination M022 ou M071 ne permet pas d'activation cellulaire orientée contre le peptide M2.....-	88 -
 DISCUSSION	 - 92 -
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 - 99 -
 BIBLIOGRAPHIE	 - 101 -

LISTE DES FIGURES

- * Figure N°1 : Ribonucléoprotéine virale complexée aux trois polymérases PA, PB1 et PB2 (Futur-science. com).....- 23 -
- * Figure N°2 : Représentation schématique d'un influenza virus de type A.- 26 -
- * Figure N°3 : Représentation 3D de la protéine M2 (Jasson 2008).....- 30 -
- * Figure N°4 : Illustration schématique de l'activation du canal à protons. Pour plus de clarté, seuls deux des quatre monomères sont représentés.....- 31 -
- * Figure N°5 : Diagramme simplifié du taux de glissement antigénique selon le degré d'immunité de la population. (Maciej 2008).....- 35 -
- * Figure N°6 : Illustration d'un glissement antigénique au cours du temps intervenant sur le gène de l'hémagglutinine. (Loevenbruck 2008).....- 36 -
- * Figure N°7: Illustration de cassure antigénique entre des virus influenza A aviaire et humain et émergence de nouvelles pandémies. (Laver 2002).....- 38 -
- * Figure N°8 : Relation génétique entre les influenza virus aviaires, humains et porcins de 1918 à 2009. (NAID 2009)- 40 -
- * Figure N°9 : Les différentes étapes du cycle d'un influenza virus.- 45 -
- * Figure N°10 : Le virus myxomateux sous ses deux formes : virion intracellulaire mature (VIM) et virion extracellulaire enveloppés (VEE). (Viral Zone 2009).....- 64 -
- * Figure N°11 : Génome des virus du genre Poxvirus- 65 -
- * Figure N°12 : Evaluation de la protection clinique conférée par M022 et M071- 78 -
- * Figure N°13.1 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris témoins négatifs non stimulées.....- 79 -
- * Figure N°13.2 : Marquage intracellulaire IL-2 et INF pour les souris témoins négatifs stimulées P.I.- 80 -
- * Figure N°13.3 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris témoins positifs immunisées PR8 et restimulées PR8.- 81 -
- * Figure N°13.4 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris vaccinées M022 et restimulé M022.- 83 -
- * Figure N°14.1 : Concentrations moyennes en IL-2 et en IFN obtenues par ELISA dans les lots naïfs et immunisées PR8.- 84 -
- * Figure N°14.2 : Concentrations moyennes en IL-2 et en IFN γ obtenues par test ELISA à partir des surnageants des splénocytes de nos lots de souris vaccinées.- 86 -

- * Figure N°15.1 : Profil de division par marquage CFSE des lymphocytes naïf.....- 88 -
- * Figure N°15.2 : Profil de division obtenu par marquage CFSE des lymphocytes immunisés par PR8.....- 89 -
- * Figure N°15.3 : Profil de division obtenu par marquage CFSE des cellules immunisées avec M022.- 90 -
- * Figure N°15.4 : Profil de division obtenu par marquage CFSE des cellules immunisées par M071.- 90 -

LISTE DES TABLEAUX

- ❖ Tableau N°1 : Caractéristiques des différents sérotypes d'influenza virus (Schaechter 1999).....- 22 -
- ❖ Tableau N°2 : Les segments d'ARN du virus influenza et les protéines qu'ils codent. (Schaechter 1999).....- 24 -
- ❖ Tableau N°3 : distribution des sérotypes d'hémagglutinine retrouvés dans différentes espèces selon les données du NCBI (Gatherer 2009)- 25 -
- ❖ Tableau N°4 : Nouvelle classification des souches influenza virus, définie par l'OIE depuis 2006.- 28 -
- ❖ Tableau N°5 : Séquences extracellulaires de protéine M2. (Huleatt 2007).....- 29 -
- ❖ Tableau N°6 : Bilan des effets antiviraux des anticorps (Roitt 2002).....- 50 -
- ❖ Tableau N°7 : aperçu des différents types de vaccins testés utilisant M2 (Schotsaert 2009).....- 55 -
- ❖ Tableau N°8 : Classification des Chordopoxvirinae et place du virus myxomateux. (Van Regenmortel 2000).....- 63 -
- ❖ Tableau N°9 : Quelques gènes immunomodulateurs des virus myxomateux (Zuniga 2003).....- 94 -

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

- * AC : Anticorps
- * ACn : Anticorps naturels
- * ADN : acide désoxyribonucléique
- * Ag : Antigène
- * AMM : Autorisation de mise sur le marché
- * ARN : acide ribonucléique
- * Asp 44 : Acide aspartique 44
- * BCG : Bacille de Calmette et Guérin
- * CCAD : Cytotoxicité cellulaire AC dépendante
- * CFSE : Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
- * CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- * CPA : Cellules présentatrices d'antigène
- * DCs : Cellules dendritiques
- * ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- * FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
- * Grz B : Granzyme B
- * HA : Hémagglutinine
- * HBc : Core de l'Hépatite B
- * HE : hémagglutinine estérase
- * His 37 : Histidine 37
- * HIV : virus de l'immunodéficience humaine
- * IAHP : Influenza aviaire hautement pathogène
- * IAFP : Influenza aviaire faiblement pathogène
- * IFN : Interféron
- * Ig : Immunoglobulines
- * nIg : Immunoglobulines naturelles
- * IL2 : Interleukine 2
- * IPIV : Index de pathogénicité par voie intraveineuse
- * LB : Lymphocytes B
- * LT : Lymphocytes T
- * LTc : Lymphocytes T cytotoxiques
- * NA : Neuraminidase

- * NAI : Influenza aviaire dites notifiable
- * NIAID : National Institute of Allergy and Infectious Diseases
- * NK : Natural Killer
- * NP : Nucléoprotéine
- * OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- * PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
- * PBS : phosphate buffer solution
- * RIT : Répétition inversée terminale
- * RNP : Ribonucléoprotéine
- * SARS : Syndrome respiratoire aigu sévère
- * SI : Système Immunitaire
- * TGN : Trans-golgi Network
- * TLR : Toll Like Receptor
- * TNF : Tumor Necrosis Factor
- * Trp 41 : Tryptophane 41
- * VEE : Virion extracellulaire enveloppé
- * VIM : Virion intracellulaire mature

INTRODUCTION

Les influenza virus constituent une vaste population virale responsable de ce que l'on appelle communément les gripes, à savoir une infection virale contagieuse qui s'attaque surtout de l'appareil respiratoire, souvent bénigne hormis dans une petite population à risque, mais pouvant également se traduire par des épidémies avec un fort taux de mortalité. Selon les souches, on peut observer des syndromes grippaux plus au moins sévères avec des pronostics très variables, et cela dans au moins dix-huit espèces de mammifères (Gatherer 2009). Les espèces les plus surveillées actuellement sont les volailles et le porc, en raison de l'ampleur mondiale que peut prendre la maladie animale et ce, malgré les efforts internationaux pour juguler le fléau, de ses conséquences économiques, de son potentiel zoonotique et surtout de la menace de pandémie. En effet, de façon générale, chaque souche est spécifique d'une espèce, cependant comme on a pu l'observer en Asie lors de l'épizootie aviaire H5N1 à la fin de l'année 2003, et comme nous l'a rappelé la récente épidémie de « grippe porcine », certaines souches peuvent franchir cette barrière d'espèce et contaminer l'homme. Tant que les contaminations sont épisodiques et ciblées sur une population ayant un contact très étroit avec l'espèce en question, il n'y a pas de risque sanitaire majeur, cependant lorsque ces souches d'origine animale acquièrent la capacité de se transmettre entre êtres humains, on observe des épidémies importantes, voire des pandémies (Jeannot 2010).

Les influenza, et plus particulièrement ceux du groupe A, sont à l'heure actuelle les maladies à potentiel pandémique les plus menaçantes. Ils sont les seuls capables d'infecter 30% de la population mondiale en un mois, et bien que moins mortelle qu'un certain nombre d'autres maladies (HIV, Ebola, SARS), avec un taux de mortalité de seulement 2%, ils pourraient entraîner plusieurs centaines de millions de morts en moins d'un an. Ce potentiel pandémique est lié au fort taux de mutations de ses virus, permettant aux nouvelles souches d'échapper à la réponse immunitaire mise en place précédemment (brugère picoux 2006, Gatherer 2009).

Actuellement, en termes d'immunité pour les influenza virus de type A, il y a deux éléments structuraux principaux présentant un très fort pouvoir immunogène. Il s'agit des neuraminidases (NA) et des hémagglutinines (HA) : des glycoprotéines de surfaces qui sont en conséquence massivement utilisées pour la vaccination. Ainsi, la prévention contre les gripes, humaines comme animales, saisonnières comme pandémiques, passe par l'utilisation de vaccins présentant les glycoprotéines de surface de la ou des souches isolées sur le terrain.

Cependant, il existe 16 sérotypes d'hémagglutinines et 9 de neuraminidase, et ces antigènes ont l'inconvénient de muter très rapidement soit par dérive soit par cassure antigénique, d'où l'absence d'immunité à long terme chez les individus infectés comme chez ceux vaccinés (Tria 2005). Cela oblige les laboratoires pharmaceutiques à réactualiser chaque année leurs vaccins en suivant les indications des unités du réseau de surveillance, centres collaborateurs de l'OMS, typant en routine les échantillons de virus grippaux en circulation. Par ailleurs, cela implique nécessairement que l'on ne peut pas disposer d'un vaccin efficace avant plusieurs mois lors de l'émergence d'une nouvelle souche hautement contagieuse (Cole 2010).

En termes de lutte, les seuls traitements disponibles actuellement pour les personnes déclenchant la maladie sont le Tamiflu® (oseltamivir) et le Relenza® (zanamivir). Ces deux médicaments sont des inhibiteurs des neuraminidases des influenza A et B, cependant de plus en plus de résistances sont observées, en lien avec l'apparition fréquente d'un certain nombre de mutations en partie connues aujourd'hui (Collins 2009).

C'est dans ce contexte, face à la difficulté d'actualiser les vaccins influenza, l'émergence de résistances aux antiviraux connus et la crainte de voir surgir une nouvelle souche pandémique dont on ne peut prédire le sérotype, qu'un autre élément structural – découverte plus récemment et sur lequel porte cette étude – peut se révéler intéressant en termes de vaccination. Il s'agit d'une protéine transmembranaire jouant le rôle de pompe à protons, nommée M2 pour le type A. La mise au point d'une nouvelle génération de vaccins se basant, non plus sur l'immunisation contre des glycoprotéines extrêmement variables mais contre des éléments conservés, semble de plus en plus nécessaire. La protéine de matrice M2 présente cette caractéristique et est aujourd'hui au cœur de nombreuses études. Les inconvénients de cette protéine sont son petit poids moléculaire et son faible pouvoir immunogène en condition naturelle. Tout l'enjeu de la réalisation des vaccins anti-M2 est donc de présenter correctement cette protéine pour la rendre suffisamment visible par le système immunitaire.

L'étude mise en place par l'équipe IHVV de l'UMR 1225 INRA-ENVT consiste à mettre au point et à tester un nouveau vaccin recombinant intragénique attachant la fraction extracellulaire de la protéine M2 aviaire à une protéine d'enveloppe d'un virus myxomateux. L'évaluation de son efficacité s'est articulée en deux parties dont la première, correspondant à l'étude clinique, a fait l'objet d'une thèse rédigée par M. Kevin Ortion. Pour la seconde partie, nous nous intéresserons à l'évaluation de l'efficacité vaccinale à l'échelle cellulaire.

Pour cela, notre étude est constituée d'un premier volet bibliographique regroupant trois thèmes. Nous présenterons tout d'abord les caractéristiques virologiques des influenza virus, en insistant sur la description de la structure et du fonctionnement de la protéine M2. Nous reprendrons ensuite les grands points de l'histoire de cette famille virale et ses conséquences actuelles. Et enfin, nous rappellerons le fonctionnement général de l'immunité anti-influenza. Le second volet présentera le travail expérimental, avec les méthodes utilisées pour mettre en évidence la réponse immunitaire lymphocytaire, les différents résultats obtenus, ainsi qu'une discussion.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES INFLUENZAVIRUS ET LA PROTEINE M2

1.1. Virologie

1.1.1. Classification

Les influenza virus appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Elle comprend trois genres dont le premier est constitué par les influenza virus de type A et B, le second par les influenza virus de type C, et enfin le dernier par les *Thogotovirus*. Les trois types d'influenza ont été initialement définis sérologiquement. L'infection par l'un des sérotypes ne confère aucune protection vis-à-vis des autres sérotypes. D'importantes différences structurales, épidémiologiques et cliniques séparent ces trois types (cf tableau n°1).

	A	B	C
Sévérité de la maladie	++++	++	+
Réservoir animal	Oui	Oui	Non « phoque »
Diffusion chez l'homme	Pandémique	Epidémique	Sporadique
Changement antigénique	Dérive et cassure	Dérive	Dérive
Nombre de segment d'ARN	8	8	7
Nombre de glycoprotéine de surface	2	2	1

❖ **Tableau N°1 : Caractéristiques des différents sérotypes d'influenza virus (Schaechter 1999)**

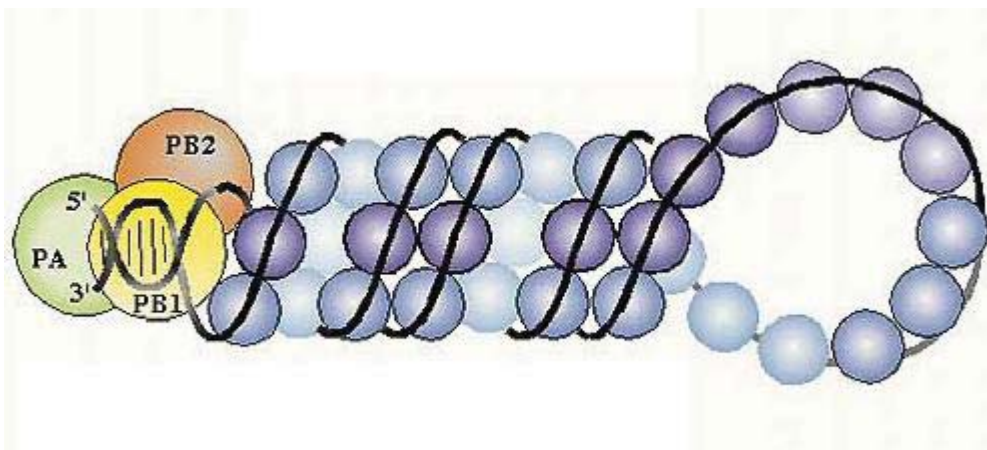
Les particularités structurales seront décrites plus précisément par la suite. Epidémiologiquement, les influenza virus de type A sont les plus répandus et se rencontrent chez une vingtaine d'espèce (oiseaux aquatiques et terrestres, mammifères marins et terrestres dont l'Homme). Les influenza virus de type C peuvent également se rencontrer chez plusieurs espèces, à savoir l'Homme, la volaille et l'espèce porcine. Le type B, quand à lui, est pour quasiment spécifique à l'Homme, même s'il peut aussi infecter les phoques. (Osterhaus 2000)

Cliniquement, les virus de type A et B sont responsables des épidémies grippales annuelles, mais seules les virus de type A sont à l'origine de pandémies grippales. Le virus de type C semble lié à des cas sporadiques et donne le plus souvent une grippe d'expression modérée. (Hay 2001)

1.1.2. Structure et propriétés

Ce sont des virus enveloppés, mesurant entre 80 et 120 nanomètres, de forme sphérique (ovale ou allongée le plus souvent) ou filamenteuse, à ARN monocaténaire, de polarité négative (cela signifie que ces ARN doivent subir une étape de transcription avant de pouvoir être traduits en protéines).

Concernant le génome, il comprend tantôt huit segments indépendants (type A et B) tantôt sept (type C). Ces segments d'ARN codent pour huit ou onze polypeptides, qui sont pour la plupart des protéines structurales (cf tableau n°2). Chaque segment est également associé au complexe de transcription et de réplication du virus (protéines PB1, PB2 et PA ou P3 pour le type C) ainsi qu'à une nucléoprotéine majoritaire (NP) faisant partie des antigènes internes du virus déterminants le type viral, et assurant la cohésion de l'ensemble. Cette association constitue la ribonucléoprotéine (RNP) (cf figure n°1). (NG 2009)



* *Figure N°1 : Ribonucléoprotéine virale complexée aux trois polymérases PA, PB1 et PB2 (Futur-science. com)*

SEGMENT D'ARN	PROTEINES	FONCTION ET LOCALISATION DANS LE VIRION
1	Polymérase B2	Synthèse de l'ARN ; protéine de capsid
2	Polymérase B1	Synthèse de l'ARN ; protéine de capsid
3	Polymérase A	Synthèse de l'ARN ; protéine de capsid
4	Hémagglutinine	Attachement à la surface cellulaire
5	Nucléoprotéine	Synthèse de l'ARN ; protéine de capsid
6	Neuraminidase	Détachement du virus de la surface cellulaire
7	Protéines de matrice M1 et M2	Maturation virale, enveloppe, régulation du pH
8	Protéines non-structurales 1 et 2	Synthèse de l'ARN ? Non-structurales

❖ *Tableau N°2 : Les segments d'ARN du virus influenza et les protéines qu'ils codent. (Schaechter 1999)*

L'enveloppe lipidique est constituée par une couche phospholipidique sous-tendue par la protéine virale M1.

Cette enveloppe comporte également une protéine transmembranaire jouant le rôle de pompe à proton, nommée M2 pour le type A, NB pour le type B et CM2 pour le type C. (Betakova 2007)

Enfin cette enveloppe est hérissée de spicules correspondant à une ou deux sortes de glycoprotéines de surface selon le type d'influenza virus. Les glycoprotéines de surface sont parmi les protéines virales les plus étudiées et semblent constituer les déterminants de virulence les plus importantes. Elles migrent à la surface cellulaire où elles s'assemblent en plaques en chassant les protéines cellulaire membranaire. Chaque spicule possède une extrémité hydrophobe qui est enchâssée dans l'enveloppe lipidique et une extrémité hydrophobe qui fait saillie vers l'extérieur.

Pour les types A et B, 40% de ces glycoprotéines sont des hémagglutinines (HA). Un spicule est ici formé par l'association de trois polypeptides identiques en forme de baguette. Elles confèrent au virus son pouvoir infectieux en permettant sa fixation sur l'acide sialique terminal des cellules de l'épithélium cilié de l'arbre respiratoire. Elles sont activées après clivage en deux parties par une protéase de la cellule hôte (HA1 et HA2 restant liées par un pont disulfure). (Cross 2009)

Les 60% restant correspondent aux neuraminidases (NA) ressemblant à une projection de la surface cellulaire en forme de champignon à tête carrée. Chaque spicule est formé de quatre peptides identiques avec une extrémité hydrophobe insérée dans l'enveloppe virale et une tige avec une tête hydrophobe en relief vers l'extérieur. Elles assurent le clivage de la liaison HA-acide sialique afin de libérer les virus néoformés et de permettre leur dissémination en assurant le relargage des résidus d'acide salicylique des membranes virales et cellulaires. (Cong 2009)

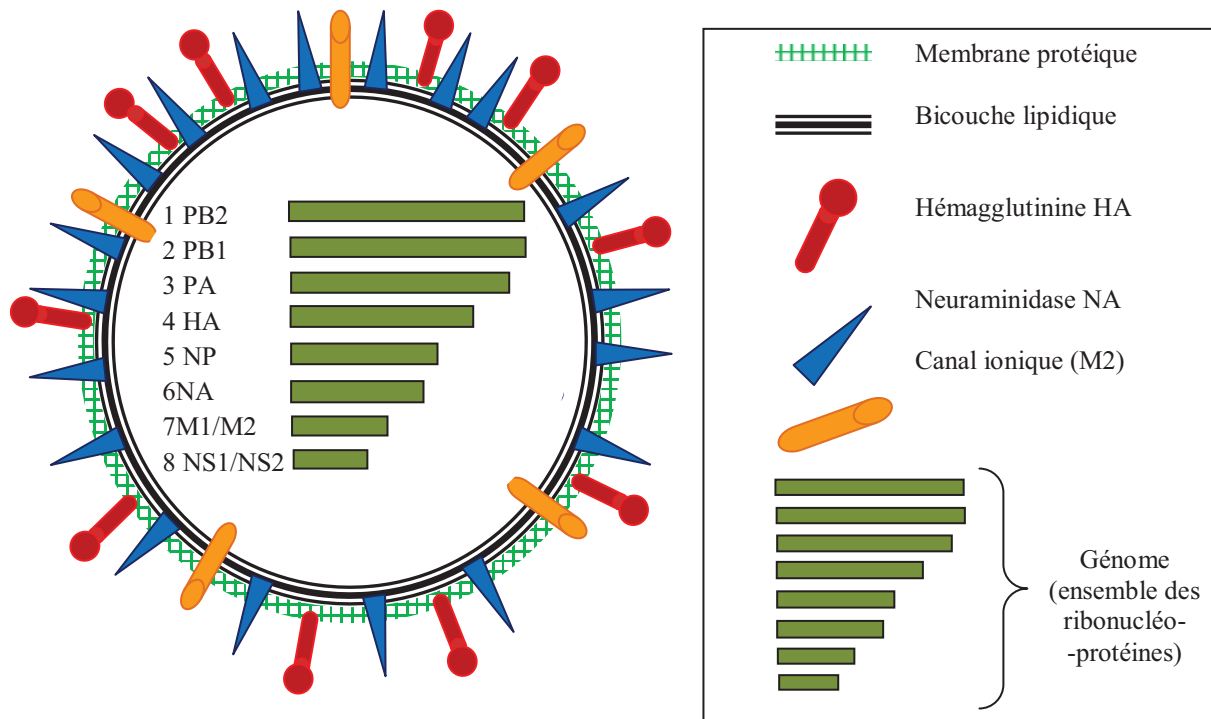
Pour les virus de type C, 100% des spicules correspondent à des hémagglutinine estérase (HE) assurant à la fois le rôle de fixation et de libération. Elles sont activées elles aussi par clivage en deux parties (HE1 et HE2). (Gouarin 2008)

Pour les hémagglutinines et comme pour les neuraminidases il existe des séquences hautement conservées et d'autres très variables. Les domaines variables des hémagglutinines et des neuraminidases sont importants pour le sérotypage et la reconnaissance immune.

La grande diversité de souches au sein des types A et B résulte de l'existence de 16 sous-types d'HA et de 9 sous-types de NA permettant la réalisation de 144 combinaisons différentes, dont 103 seulement ont été isolées. (Kaleta 2005).

Espèces	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	Total
oiseaux	93	105	265	212	1918	370	509	26	904	86	88	44	39	3	6	14	4 682
mouche					1												1
chameau	1																1
chien	8																8
chat							7										7
civette					1												1
cheval			164				17										181
furet	1																1
fourmilier	1																1
human	1802	106	4610		224		8		8								6 758
léopard					6												6
vison			1		1					1							3
rat musqué				1													1
pika plateau					1												1
chien viverrin					1												1
phoque			2	1			2										5
fouine		1															1
cochon	419	2	238	2	22				28								701
tigre					7												7
baleine					7								1				8
Total	2325	214	5280	216	269	370	543	26	940	87	88	44	40	3	6	14	12375

❖ **Tableau N°3 : distribution des sérotypes d'hémagglutinine retrouvé dans différentes espèces selon les données du NCBI (Gatherer 2009)**



* **Figure N°2 : Représentation schématique d'un influenza virus de type A.**
 (Sa taille est d'environ 100 nanomètres).
 Inspiré de « veterinary microbiologie », Ardan 1999.

1.1.3. Nomenclature

Les virus influenza sont désignés selon la nomenclature officielle, proposée par le comité d'experts de l'OMS. Plusieurs nomenclatures se sont succéder pour tenir compte de l'évolution des connaissances, la version actuelle étant en application depuis janvier 1972. Elle reprend les informations suivantes :

- 1 - le type antigénique (A, B, ou C)
 - 2 - l'espèce animale chez laquelle le virus a été isolé, sauf chez l'homme
 - 3 - la région ou le pays de l'isolement
 - 4 - un numéro de référence un nom
 - 5 - l'année d'isolement
 - 6 - les sous-types H et N entre parenthèse pour les virus de type A
- (WHO expert comitee 1971)

Citons comme exemple A/ Dinde/ Angleterre/ 199/ 79 (H7N7) correspondant à la souche virale de type A, numéro 199, isolée en 1979 en Angleterre sur des dindes, et présentant les antigènes de surface H7 et N7.

Cette nomenclature permet de mieux apprécier les mutations d'un sous-type donné. Ainsi la circulation prolongée d'un sous-type et son adaptation progressive à une espèce peut correspondre à l'acquisition de caractères génétiques nouveaux permettant de différencier une nouvelle lignée au sein du sous-type d'origine. Par exemple, on distingue aujourd'hui une lignée porcine, une lignée aviaire et une lignée humaine dans le sous-type H1N1. (Lu 2009)

Concernant les influenza aviaires, leur définition a été revue en janvier 2006 (cf tableau n°4), pour tenir compte des avancés scientifiques mettant en évidence le fait que les souches dites « hautement pathogène » (IAHP) des sous types H5 et H7 dérivent de souches dites « faiblement pathogène » (IAFP). Cette approche est essentielle pour la prévention et le contrôle des futures épidémies, notamment par la surveillance des IAFP. Actuellement on parle d'influenza aviaires dites notifiables (NAI). Ce sont les infections dues à un virus de sous-type H5 ou H7, et les infections dues à n'importe quel sous-type autre ayant un indice de pathogénicité (IPIV) supérieur à 1,2, ou entraînant une mortalité supérieure à 75%.

L'IPIV est calculé en inoculant du virus influenza par voie intraveineuse à des poulets sensibles de six semaines. On observe quotidiennement les manifestations cliniques et on leur attribue une cotation allant de 0 à 3 selon leur gravité, l'IPIV correspondant à la moyenne de ces cotations. Le test dure au maximum 11 jours à dater de l'inoculation mais la réponse peut être obtenue en 24-48 heures pour les souches les plus virulentes. En cas d'absence de manifestation clinique au huitième jour après l'inoculation (neuvième jour du test), il est déjà acquis que l'indice de pathogénicité ne pourra plus dépasser la valeur limite de 1,2 au delà de laquelle le virus est considéré comme hautement pathogène.

Parmi ces NAI on distingue les souches faiblement pathogène (FPNAI) et les hautement pathogènes (HPNAI) :

- Les HPNAI sont ceux ayant un IPIV sur poulets de 6 semaines supérieur à 1,2 ou entraînant une mortalité supérieure à 75% sur des poulets de 4 à 8 semaines infectés par voie intraveineuse. Les souches H5 ou H7 ne remplissant pas ces conditions doivent être séquencées. Si le résidu α -aminoacide au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine est

similaire à celui observé sur une autre souche hautement pathogène isolée, alors la souche séquencée doit être classée dans les HPNAI.

- Les FPNIA sont les souches H5 ou H7 ne remplissant pas les conditions pour être classées hautement pathogène.

Enfin, au vu de cette nouvelle définition, le terme d'influenza aviaire faiblement pathogène (FPIA) est à présent utilisé pour les virus n'étant pas des NIA. (Capua 2007)

NIA	HPNIA	<p>* Pas de restriction de souche</p> <p>* Remplie au moins une de ces conditions :</p> <p>1 - IPIV supérieur à 1,2.</p> <p>2 - mortalité supérieure à 75%.</p> <p>3 - motif amino acide du site de clivage de l'hémagglutinine similaire à celui d'une HPNIA identifiée.</p>
	FPNIA	* Souche H5 et H7 ne remplissant pas une des trois conditions citées ci-dessus.
FPIA		* Souches autres que H5 ou H7 ne remplissant pas les conditions pour être une NIA

❖ *Tableau N°4 : Nouvelle classification des souches influenza virus, définie par l'OIE depuis 2006.*

1.2. La protéine M2

1.2.1. Structure

La protéine M2 est abondamment exprimée à la surface des cellules infectées, elle l'est aussi, quoique dans une moindre proportion, à la surface de la particule virale.

Elle est constituée de 97 acides aminés, dont l'extrémité amino-terminale de 23 résidus est exposée à la surface. La partie transmembranaire est pour sa part constituée de 20 acides aminés, les 53 résidus restant constituant la portion cytoplasmique de la protéine. (Lawrence 2006)

L'alignement des séquences amino-terminales de cette protéine dans différentes souches a montré leur extrême conservation phylogénétique (cf tableau n°5).

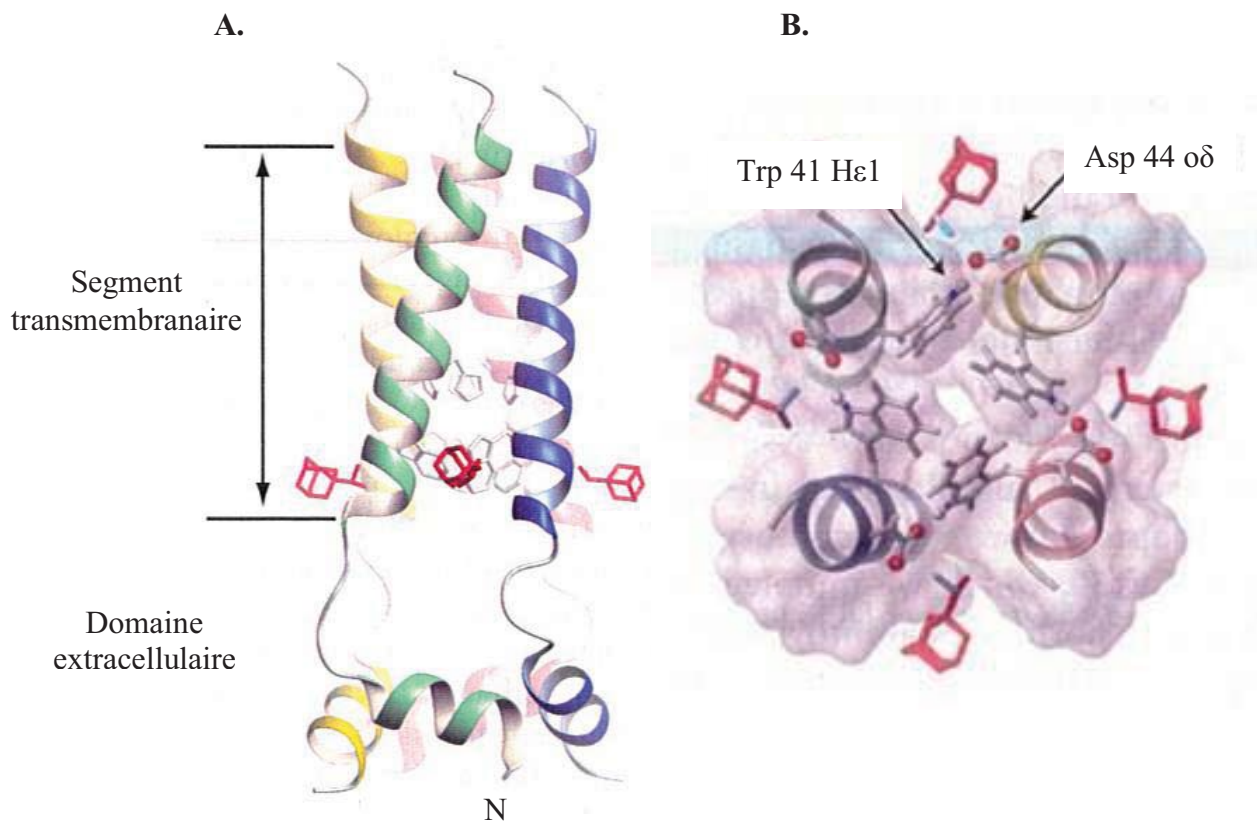
<i>SOUCHE</i>	<i>SEQUENCE EXTRACELLULAIRE DE M2</i>
Séquence dite universelle (de terrain)	LLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
H1/H2/H3 consensus	LLTEVETPIRNEWGSRNDSSD
A/New Caledonia/20/99	LLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Aichi/470/68	LLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Canada/720/05	LLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Berkeley/1/68	LLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
A/Puerto Rico/8/34 (PR8 utilisé)	LLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
A/Wisconsin/3523/88	LLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD
A/Hebei/19/95	LLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
Souche utilisée pour le vaccin : A/avian/Netherlands/219/03	LLTEVETPTRNGWECKCNDSSD

❖ *Tableau N°5 : Séquences extracellulaire de protéine M2. (Huleatt 2007)*

M2 est un homotétramère, c'est-à-dire deux dimères liés par des ponts disulfures et réunis par des liaisons non covalentes.

Les quatre hélices transmembranaires forment un canal à proton dans l'enveloppe lipidique virale, au sein duquel un certain nombre de résidus jouent un rôle majeur. A l'heure actuelle on peut déjà en citer 3 : les résidus histidyl His 37, tryptophanyl Trp 41 et aspartyl Asp 44 dont nous verrons les rôles ultérieurement.

L'orientation et le caractère hydrophobe de la portion C-terminale suggèrent qu'elle est placée le long de la surface membranaire. Ainsi les hélices intra-cytoplasmiques sont orientées presque perpendiculairement aux spirales transmembranaires et forment une base du côté interne de la membrane. (cf figure n°3)



* **Figure N°3 : Représentation 3D de la protéine M2 (Jasson 2008)**

A. : représentation de la structure d'une protéine M2 montrant les hélices transmembranaires et la base constituée par les hélices intra-cytoplasmiques

B. : représentation de l'extrémité C-terminale montrant les liaisons hydrogène intermonomères entre le résidu Trp 41 d'une hélice transmembranaire et le résidu Asp 44 de l'hélice transmembranaire adjacente, intervenant dans la stabilisation du canal à proton.

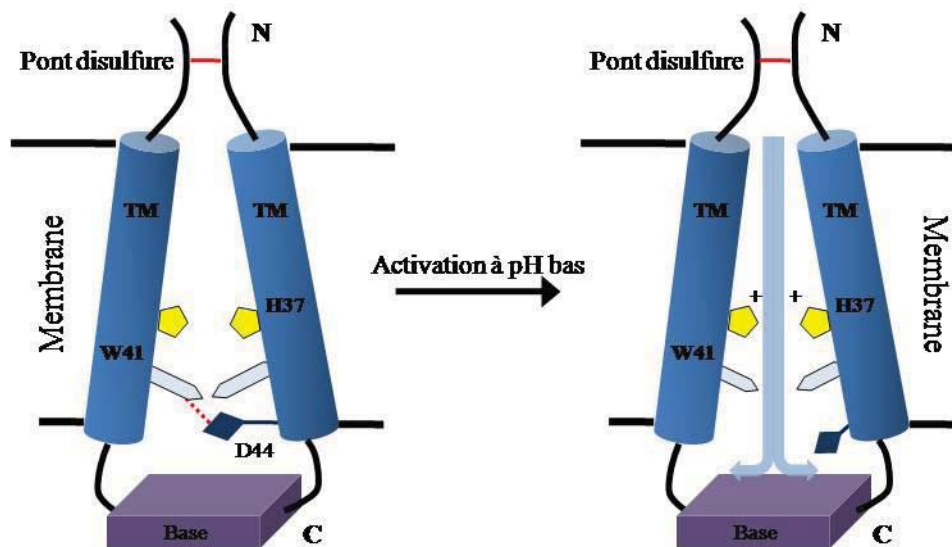
(Les structures rouges représentent des molécules de rimantadine et la manière dont elles interagissent avec la protéine M2)

1.2.2. Mécanisme d'activation du canal

Dans leur état fermé, les quatre hélices transmembranaires fermement assemblées définissent un canal étroit où les interactions intermoléculaires entre le tryptophane (Trp 41) et l'acide aspartique (Asp 44) jouent le rôle de portes, et où les résidus d'histidine His 37, celui de serrures en servant de capteur à pH. En effet, la conduction des protons n'est activée que lorsque trois résidus His 37 sont chargés, ce qui implique d'être en milieu légèrement acide (pH proche de 6,5). (Conggang 2007)

Ces hélices sont hautement sélective pour les protons, cette sélectivité étant assurée par les résidus d'histidine. On observe *in vitro* que si on remplace His³⁷ par un autre acide aminé (alanine, glutamine, sérine, thréonine) le canal mutant constituer devient capable de conduire aussi bien les Na⁺, ou les K⁺ que les protons. (Ventakaraman 2005)

Le canal se ferme quand le pH extérieur excède 7,5, et il s'ouvre quand il descend en dessous de 6,5 ainsi lors de l'internalisation du virion dans une cellule, le faible pH des endosomes déstabilise la structure hélicoïdale transmembranaire, ouvrant ainsi le canal et permettant le passage de l'eau conduisant les protons. Pendant ce temps, la base C-terminale et les liaisons disulfures de l'extrémité N-terminale empêchent la dissociation du tétramère. (Tang 2002)



* **Figure N°4 : Illustration schématique de l'activation du canal à protons. Pour plus de clarté, seuls deux des quatre monomères sont représentés.**

A pH élevé, les hélices transmembranaires sont fermement associées et la porte tryptophane est fermée grâce aux interactions intermoléculaires impliquant l'Asp 44. A pH faible, la protonation des résidus His 37 déstabilise l'interaction des hélices transmembranaires, permettant le passage de l'eau et des protons via le canal. La base C-terminale du tétramère et les ponts disulfures de l'extrémité N-terminale permettent au canal de garder sa structure générale.

1.2.3. Rôle de la protéine M2

Ainsi, cette protéine est avant tout un canal à protons s'activant à pH acide. Elle est impliquée dans le cycle viral dans la mesure où le passage des protons acidifie l'intérieur du virus et facilite ainsi la dissociation des protéines de matrice et des nucléoprotéines. En plus de son rôle dans la libération du génome viral, la présence de la protéine M2 dans les membranes du Trans-Golgi Network (TGN) empêche, pendant le transport à la surface cellulaire, le réarrangement prématuré des hémagglutinines synthétisées en équilibrant le pH du TGN avec celui du cytoplasme de la cellule-hôte. (Jason 2008)

Des études ont également révélé qu'en plus d'être essentielle à la stabilisation de l'ensemble de la structure, la partie cytoplasmique de la protéine M2 jouait elle aussi un rôle majeur dans la réplication virale. En effet, en tronquant cette portion, on observe un défaut d'incorporation de l'ARN viral (vARN) dans le virion, ce qui suggère son implication dans le recrutement des complexes M1-vARN. L'interaction entre M1 et la portion cytoplasmique de M2 semble essentielle pour induire le recrutement des protéines internes et de l'ARN viral sur la membrane plasmique, nécessaire à l'assemblage des virions. (Chen 2008)

Ainsi cette protéine est essentielle à la réplication des virus influenza à l'intérieur de l'hôte, et c'est pourquoi elle est actuellement une cible thérapeutique importante. Elle est inhibée par l'amantadine et la rimantadine, cependant de plus en plus de résistance sont observées pour ces médicaments. (Du 2010)

2. LES ENJEUX ACTUELS DES INFLUENZAS AVIAIRES

Il paraît important de décrire la place qu'ont les influenza virus aviaires dans le contexte économique et sanitaire actuel afin de démontrer l'intérêt majeur de la réalisation d'un nouveau vaccin. Avant toute chose, il nous paraît nécessaire de resituer ces virus dans leur contexte historique.

2.1. Petite histoire des « Pestes aviaires » et découverte des influenza virus

Les pestes aviaires sont devenues tristement célèbres en 1997, lors de l'épisode de la grippe du poulet de Hong Kong, où pour la première fois on y a vu associées de la mortalité humaine (6 personnes sur les 18 cas recensés). Cependant, ce n'était pas la première fois qu'elles faisaient parler d'elles.

Il est difficile de savoir à quand remontent exactement les premiers cas de peste aviaire vraie liés à un influenza virus car, avant la fin du XIX^{ème} siècle, on portait peu d'attention à la volaille, moins intéressante d'un point de vue économique que les autres denrées animales. De plus, même lorsque certaines personnes prirent le temps de se pencher sur leurs maladies, les symptômes étant peu univoques, elles ont été confondues avec d'autres maladies aviaires entraînant des épisodes de mortalité massive telle que la pseudo- peste aviaire (maladie de Newcastle), la variole ou le choléra aviaire.

On ne peut que constater que, depuis l'antiquité, où Virgile décrit la mortalité concomitante du bétail, de l'homme et des oiseaux, jusqu'au XIX^{ème} siècle, des chroniqueurs du monde entier et de tout siècle mentionnaient des épisodes marquants de maladies aviaires mortelles associées ou non à la contamination d'autres espèces.

Les choses se précisèrent en 1880 lorsque deux italiens, Rivolta et Delprato, mirent en évidence le fait qu'il existât une maladie dont la clinique fût différente de celle du cholera. Ils la baptisèrent à l'époque le « typhus exsudatif » et, suite à cette découverte, de nombreux microbiologistes à travers toute l'Europe tentèrent sans succès d'isoler l'agent en cause. En 1901, Centanni et son élève Savonuzzi firent un premier pas en établissant que « cette maladie n'est ni le choléra des poules, ni une infection due à un virus décelable par les méthodes actuelles ». Par ailleurs, en 1926, à l'occasion d'une épizootie observée aux Indes néerlandaises puis en Angleterre par Doyle, la maladie de Newcastle ou « pseudo- peste

aviaire » fut décrite pour la première fois et reconnue comme épidémiologiquement différente de la peste aviaire.

Ce n'est qu'en 1955 que le virus de la peste aviaire « vraie », fut finalement identifié et classé dans la famille des *Orthomyxoviridae* regroupant les influenza virus. (Blancou 2007) Par la suite de nombreux travaux permirent de découvrir toute la complexité et l'étendue de cette famille de virus.

En novembre 2004, le NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), en collaboration avec différents partenaires, lançaient un grand projet de séquençage du génome des virus influenza (Influenza Genome Sequencing Project). Pour cela les chercheurs utilisaient des souches non pré-sélectionnées pour leur virulence ou leurs caractéristiques inhabituelles, ce qui leur permettait d'avoir un regard relativement impartial. Par ailleurs, considérant le fait que les souches provenaient d'une zone géographique limitée à l'état de New York et collectées sur une période de cinq ans, leur étude révélait une surprenante diversité génétique indiquant que le réservoir de souches influenza A, et le potentiel associé de réassortiment génétique entre souches, pourrait être plus grand que ce qui était jusqu'alors supposé.

L'accès au génome complet de milliers d'influenza virus humains et aviaires aide les chercheurs à comprendre comment le virus de la grippe évolue, se dissémine et devient pathogène. Les informations obtenues, et notamment l'identification des facteurs génétiques déterminant leur virulence, permettent de comprendre les modalités d'émergence d'épidémies et de pandémie grippale. (Ghedin 2005)

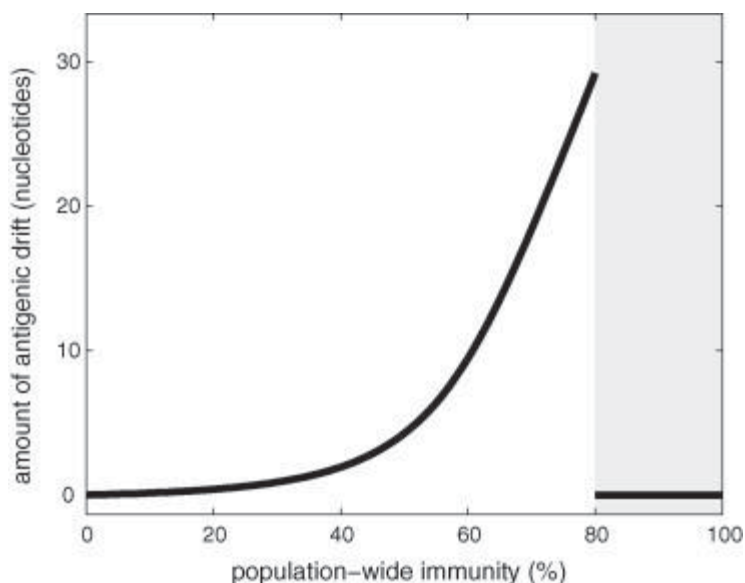
2.2. Rôle des mutations dans l'émergence d'épidémie ou de pandémie et relation entre les virus aviaires, humains et porcine

Les influenza virus peuvent évoluer par deux mécanismes que sont les glissements (ou dérive) et les cassures antigéniques (respectivement appelé « drift » et « shift » en anglais).

2.2.1. Les glissements antigéniques

Les glissements sont des mutations se produisant au moment de la synthèse des ARN viraux en relation avec le peu de fiabilité de l'enzyme ARN-polymérase virale dont les erreurs de lecture commises au cours de la réplication virale ne sont pas réparées.

Un autre phénomène semble également entrer en compte, à savoir la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants sur les sites antigéniques de l'HA. En effet, il semble que plus l'immunité de la population est forte, et plus l'adaptation évolutive du virus est rapide (cf figure n°5).

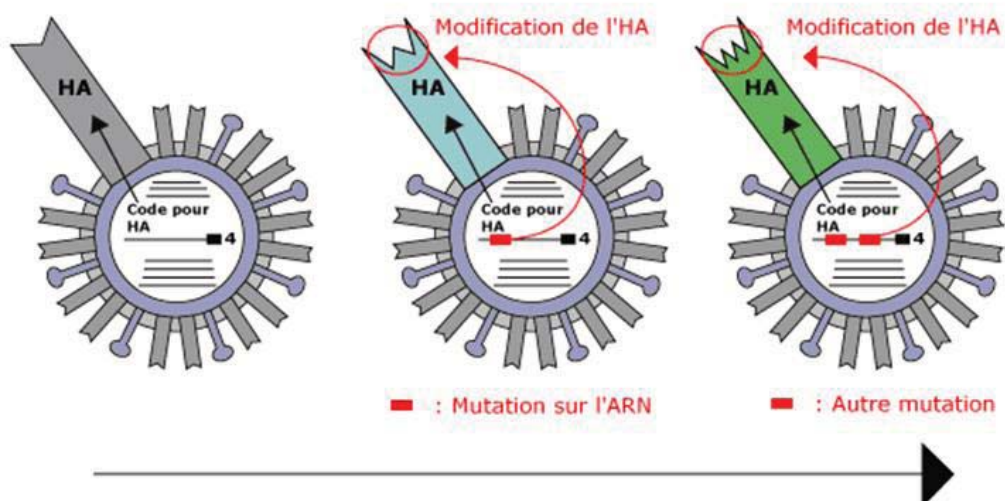


* **Figure N°5 : Diagramme simplifié du taux de glissement antigénique selon le degré d'immunité de la population. (Maciej 2008)**

L'axe vertical représente l'écart moyen entre les souches isolées au début de l'épidémie saisonnière et les souches isolées à la fin. On observe que le taux de glissement antigénique est d'autant plus important que l'immunité de la population est forte et que la pression exercée sur la population virale la force à évoluer.

Ces erreurs entraînent des mutations ponctuelles au niveau des bases nucléotidiques des gènes viraux et, par conséquent, des modifications au niveau des protéines codées. Il en résulte des variations discrètes ne modifiant pas la structure antigénique globale du virus car se sont des changements au sein de domaines restreints, discontinus et hautement variables des protéines. Il semble que ces mutations touchent essentiellement les hémagglutinines, antigène responsable de l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et dont la détection est le premier stimulus détecté par le système immunitaire de l'individu infecté, et, de façon moins fréquente, les neuraminidases. Cependant, tous les gènes codant pour les autres protéines virales peuvent *a priori* subir des mutations, dans la limite où les protéines codées par ces gènes conservent des fonctions compatibles avec la réplication virale. (Faress 2005).

Ainsi, le glissement antigénique concerne un sous-type pour lequel apparaissent des variants successifs qui diffèrent progressivement de la souche d'origine (cf figure n°6). Il concourt à l'apparition d'épidémies annuelles limitées en raison de l'échappement partiel du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Généralement, une seule variation ne suffit pas pour déjouer le système immunitaire et il apparaît que chaque nouveau variant de virus grippal A, capable de réinfecter un individu préalablement exposé, présente au moins quatre substitutions d'acides aminés au niveau d'au moins deux sites antigéniques de l'hémagglutinine.



* **Figure N°6 : Illustration d'un glissement antigénique au cours du temps intervenant sur le gène de l'hémagglutinine. (Loevenbruck 2008)**

Par les accumulations de changement d'acides aminés, l'HA « glisse » d'une forme reconnue par le système immunitaire de l'hôte vers une autre forme moins identifiable et plus à même d'infecter avec succès les individus, fussent-ils vaccinés ou non.

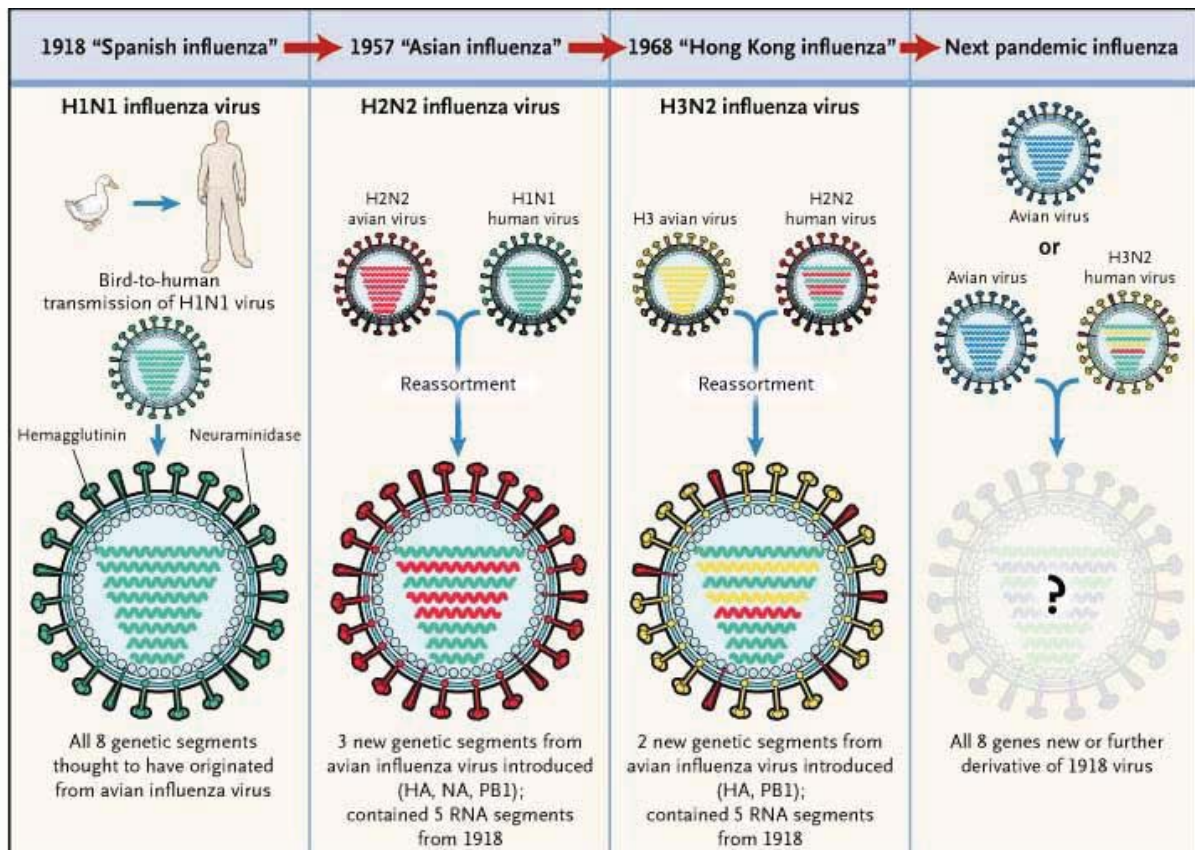
C'est pour tenir compte de ces glissements antigéniques que les vaccins grippaux saisonniers sont réactualisés chaque année par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Dans notre hémisphère, les vaccins grippaux sont élaborés en mars, à partir des souches ayant circulé dans l'hémisphère sud, afin d'anticiper sur l'épisode hivernal suivant. Durant chaque période hivernale, une surveillance des souches circulantes est assurée par l'OMS pour détecter les nouvelles souches capables d'échapper au système immunitaire. Elle fixe alors les souches virales qui composeront le vaccin antigrippal de l'année suivante en se basant sur les données épidémiologiques résultant de la surveillance des virus influenza circulants. Par exemple, en 2005, l'OMS a demandé le remplacement de la souche influenza A/Fujian/411/2003(H3N2) par la souche A/California/7/2004(H3N2). (Carrat 2007)

2.2.2. Les cassures antigéniques

Les cassures antigéniques sont des processus entièrement différents impliquant l'échange de gènes de différentes souches virales lors de l'infection simultanée d'une même cellule d'un hôte sensible par ces souches (cf figure n°7). Il en résulte des réassortiments génétiques entre des virus de sous-types différents, créant ainsi un nouvel agent inédit. Ces réassortiments concernent principalement les gènes codant pour les protéines de surface, la neuraminidase (N) et l'hémagglutinine (H). Il existe 16 sous-types H et 9 sous-types N, se qui engendre 144 combinaisons possibles NH. Bien que seulement trois de ces combinaisons (H1N1, H2N2 et H3N2) soient reconnues comme étant adaptées à l'infection de l'espèce humaine, il arrive que d'autres combinaisons, telle que H5N1, retrouvée dans le virus de la grippe aviaire, infectent de temps en temps des êtres humains.

Les huit gènes des influenza virus peuvent être considérés comme les joueurs d'une équipe, un ou plusieurs joueurs pouvant être parfois échangés avec ceux d'une autre équipe. Ainsi comprend-on bien que certaines combinaisons fonctionnent mieux que d'autres et peuvent apporter au virus de nouvelles capacités telles que celle d'infecter un nouveau type d'hôte. Les réassortiments peuvent notamment aboutir à la modification du sous-type d'hémagglutinine et/ou de neuraminidase (mais l'antigène nucléoprotéique NP est conservé et il s'agit donc toujours d'un virus de type A). Les changements génétiques sont tels que l'immunité préexistante est sans effet sur le nouveau virus. De ce fait, la morbidité et la mortalité observées sont potentiellement catastrophiques, surtout si l'agent est infectieux pour l'Homme et s'il est facilement transmissible. À l'heure actuelle, on estime que ce mécanisme intervient une fois tout les 30 à 40 ans, et les spécialistes craignent qu'une recombinaison

génétique entre un virus de la grippe aviaire A (H5N1) et un virus humain circulant puisse donner naissance à un nouveau virus hautement pathogène pour l'homme, engendrant ainsi une nouvelle pandémie. À plus forte raison, les déplacements de populations, principalement par transport aérien, favoriseraient une propagation planétaire rapide de la nouvelle souche virale. (INSPQ 2006)

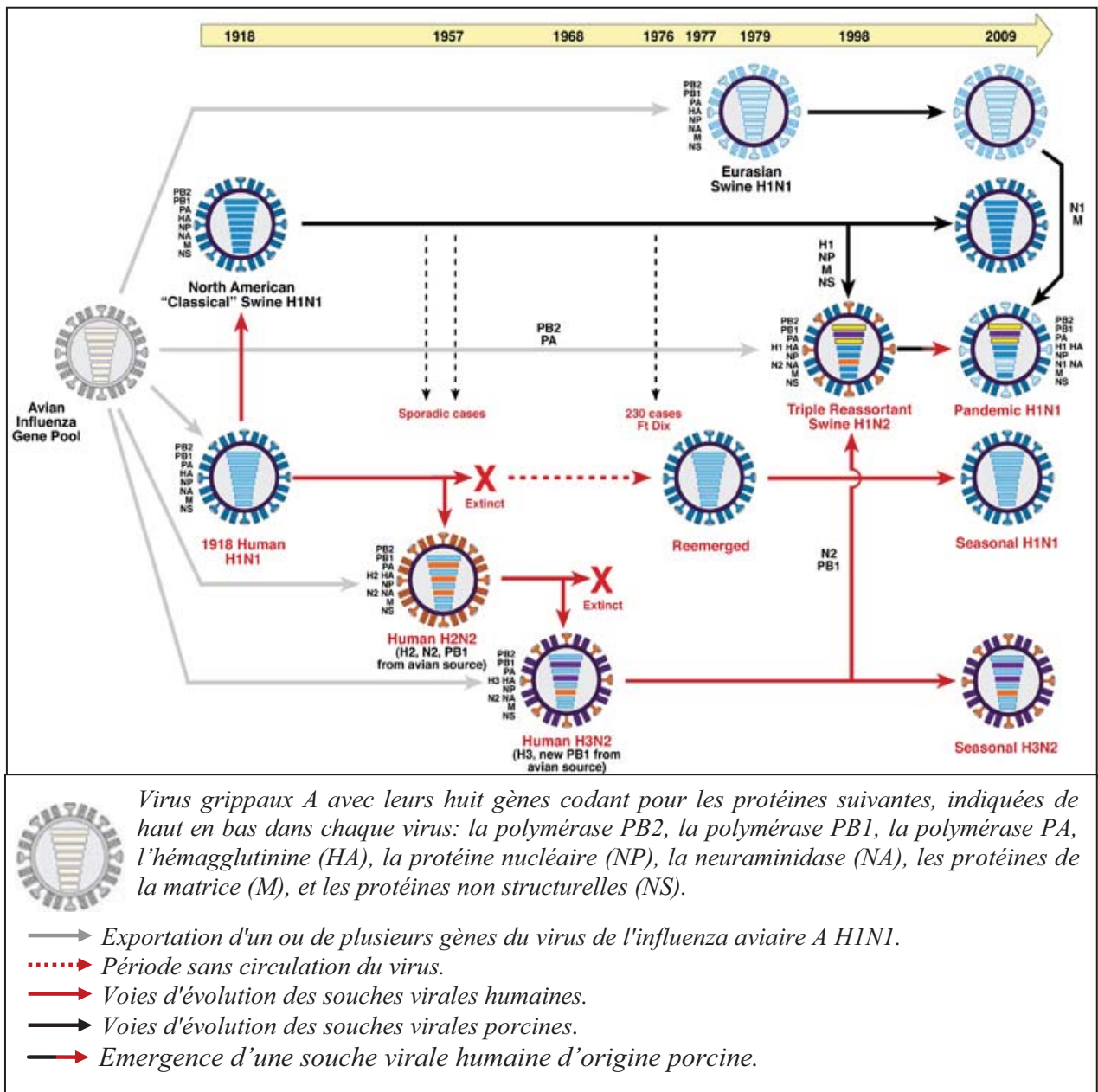


* *Figure N°7: Illustration de cassure antigénique entre des virus influenza A aviaire et humain et émergence de nouvelles pandémies. (Laver 2002)*

Le risque issu de ces mutations perpétuelles s'illustre très bien par la pandémie de 1918-1919 et par celle plus récente appelée par la presse « Grippe mexicaine ». Par rapport à l'épisode de 1918-1919, appelé également « Grippe espagnole », il est aujourd'hui reconnu que le virus initial, de souche H1N1 particulièrement virulente et contagieuse, était un virus aviaire qui aurait acquis, certainement par cassure antigénique, la capacité d'infecter l'espèce humaine et de s'y propager rapidement (cf figure n°8). C'est ce même type de mécanisme qui est actuellement redouté pour le virus aviaire H5N1.

Par ailleurs, dans un article publié le 29 juin 2009 dans le *New England Journal of Medicine*, les auteurs, expliquent que selon les récentes découvertes, ce virus aurait engendré

une descendance virale qui persisterait à ce jour et serait à l'origine de la nouvelle souche découverte au Mexique, extrêmement contagieuse et qui fait couler tant d'encre. Ainsi, outre le fait d'avoir entraîné la mort de dizaines de millions de personnes par le passé, le virus de la pandémie de 1918-1919 s'est également transmis de l'homme au porc chez qui, tout comme il l'a fait chez l'homme, il a continué d'évoluer. Depuis 1918, ce virus a survécu sous différentes formes grâce à différentes mutations et a de plus engendré une progéniture présentant de nouvelles combinaisons de gènes *via* l'importation périodique ou l'exportation de gènes viraux, aboutissant à l'émergence de cette nouvelle souche H1N1 très contagieuse chez l'homme. (Morens 2009)



* **Figure N°8 : Relation génétique entre les influenza virus aviaires, humains et porcins de 1918 à 2009. (NAID 2009)**

« Tout les virus influenza adaptés à l'espèce humaine - à la fois celles saisonnières et celles entrainant des pandémies dramatiques - sont des descendants, direct ou indirect, du virus aviaire H1N1 » Dr. Taubenberger.

2.3. L'importance des influenza virus en termes de santé publique

La grippe, ou influenza, est une des principales maladies infectieuses humaines. Elle sévit le plus souvent sous forme d'épidémies saisonnières se traduisant par une infection de l'appareil respiratoire accompagnée de toux, de fièvre, de pharyngite, de myalgie, voir d'anorexie. Ces signes cliniques apparaissent généralement de façon soudaine et disparaissent tout aussi rapidement après quelques jours d'évolution.

Ainsi, les épisodes d'influenza humaine s'accompagnent généralement d'une forte morbidité mais sont rarement létaux, hormis dans une petite sous-population à risque constituée de personnes immunodéprimées telles que les personnes âgées. Quelques souches malgré tout, très virulentes, peuvent être à l'origine de pandémie comme ce fut le cas avec la Grippe espagnole qui sévit entre 1918 et 1919 (type A, sous-type H1N1), et qui s'est révélée particulièrement mortelle (Neiryck 1999).

Souvent banalisée, la grippe sous sa forme saisonnière est déjà à elle seule un problème majeur de santé publique. On estime que lors de flambée épidémique la morbidité peut atteindre 15%, avec une létalité de 1/1000, ce qui entraîne 250 000 à 500 000 morts par ans au niveau mondial. En France on recense chaque année 1500 à 2000 décès causés par la grippe, à 90% répartie dans la fraction de la population à risque (jeunes enfant, personnes âgées, immunodéprimés). Le coût sanitaire et social annuel y est évalué à 460 millions d'euro pour une épidémie moyenne. (Site de l'OMS).

Mais cela n'est rien comparé aux pandémies grippales hautement plus meurtrières susceptibles de survenir plusieurs fois par siècle lors de l'émergence de nouvelles souches virales. Le contexte actuel nous en offre un très bon exemple puisque, comme nous l'avons observé durant ces derniers mois, un nouveau virus de la grippe (H1N1) se propage à travers le monde. Bien que relativement peu mortel pour l'instant, il ne peut être négligé du fait de sa forte contagiosité. En effet, le 10 août 2009, 46 des 53 États membres de la Région européenne de l'OMS avaient signalé plus de 33 000 cas confirmés en laboratoire, dont 55 décès dans 7 pays (Belgique, Espagne, France, Hongrie, Irlande, Israël et Royaume-Uni). Ainsi, pour contrôler son extension en Europe, tous les pays ont été mis à contribution et on peut citer par exemple l'action du Bureau régional de l'OMS qui soutient en ce moment même des activités de préparation et d'intervention ayant pour but de lutter contre la pandémie, notamment en fournissant des médicaments et du matériel de laboratoire

d'urgence, en organisant des séances de formation et en réunissant des experts afin d'améliorer les plans au fur et à mesure que la situation évolue. (Site de l'OMS)

Pour ces raisons, il n'est donc pas étonnant que depuis son apparition dans les années 1990 en Asie, la souche de virus aviaire de type A sous-type H5N1 soit également surveillée de très près. Elle fait craindre une future pandémie principalement pour deux raisons. Premièrement, c'est la souche aviaire qui a pour l'instant provoqué le plus grand nombre de cas humains très graves et le plus grand nombre de décès et elle a franchi la barrière des espèces à au moins trois reprises au cours des dernières années. La seconde raison, de loin la plus préoccupante, est que ce virus remplit toutes les conditions requises pour déclencher une nouvelle pandémie sauf celle de se transmettre efficacement et durablement d'une personne à l'autre, or les mutations constantes du virus rendent cette condition très accessible.

3. QUELQUES RAPPELS D'IMMUNOLOGIE

3.1. L'immunité anti-influenza

3.1.1. Rappel du cycle des influenza virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. En effet, dépourvus d'organites propres, ils doivent détourner la machinerie enzymatique de leur hôte pour synthétiser des protéines et métaboliser les sucres.

L'infection classique d'une cellule par un influenza virus met en jeu plusieurs étapes (cf figure n°9). Le virus doit tout d'abord se lier à des récepteurs spécifiques de la cellule hôte, définissant son tropisme. Ainsi, les virus influenza A utilisent les acides sialiques des membranes plasmiques comme récepteurs pour les HA. Les souches humaines se fixent sur des acides sialiques $\alpha(2,6)$ tandis que celle aviaires sur des $\alpha(2,3)$. Cela explique que les virus aviaires infectent moins bien l'être humain dont l'appareil respiratoire supérieur est riche en récepteur $\alpha(2,6)$. Les récepteurs $\alpha(2,3)$ sont très présents sur la muqueuse respiratoire et gastro-intestinale des oiseaux ainsi que sur la muqueuse respiratoire des souris. De plus ils sont également présents en grande quantité sur l'épithélium pulmonaire chez les humains, ce qui pourrait expliquer la propension du virus H5N1 à entraîner des pneumonies virales. Il faut préciser que malgré la présence de ces récepteurs viraux dans plusieurs cellules de l'organisme le tropisme de l'infection est limité à l'appareil respiratoire de par l'existence de protéases spécifiques permettant de cliver HA virale. Cependant chez certaines souches aviaires, les HA sont facilement clivées par des protéases ubiquistes, ce qui explique la possibilité d'infection systémique dans ces espèces. (Garcia-Sastre 1998)

Après fixation, le complexe virus-récepteur pénètre dans la cellule par endocytose, et le virus est déshabillé de ses protéines afin de libérer son acide nucléique. Comme on l'a vu, pour les influenza virus de type A, ce mécanisme met en jeu la protéine M2 qui acidifie le milieu permettant ainsi l'activation des HA et donc la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome.

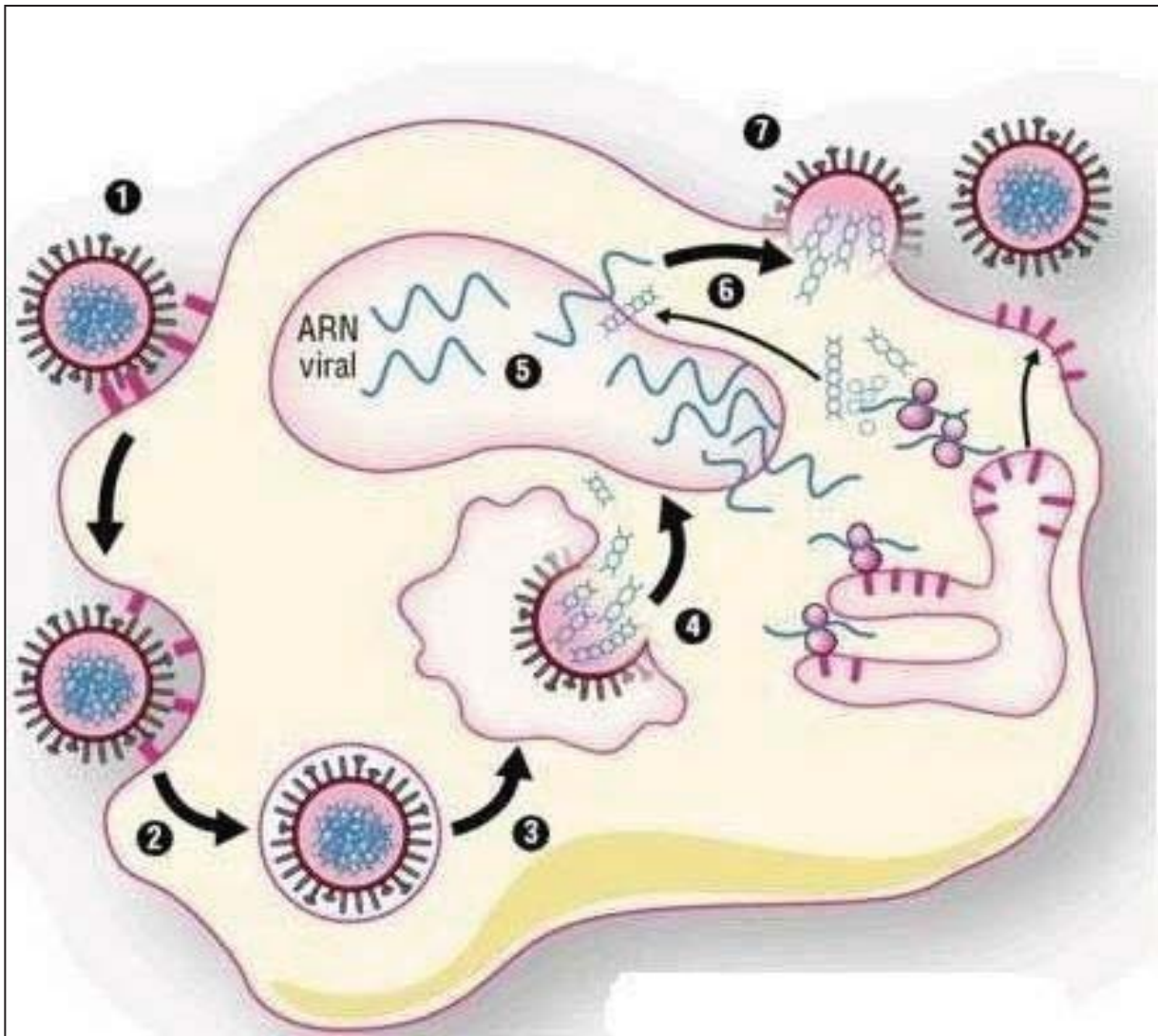
L'enveloppe virale restant associée à la membrane de l'endosome, les ARN viraux se retrouvent de ce fait libérés dans le cytoplasme et vont pouvoir ensuite pénétrer dans le noyau de la cellule. La réplication débute dans l'heure qui suit l'infection et est initiée par la transcription directe de l'ARN génomique viral. Cela ne peut être conduit que par les enzymes

de la cellule hôte et nécessite une activité ARN-polymérasique ARN-dépendante procurée par des composants de la nucléocapside virale infectante (PB1 et PB2). Les transcrits synthétisés sont de polarité positive et servent d'ARN messagers pour la synthèse des protéines. Chaque ARNm est plus long que le brin parental négatif car, après la transcription, son extrémité 5' est coiffée par une série de nucléotides méthylés et son extrémité 3' est polyadénylée. À l'inverse de la plupart des virus à ARN, la réplication des influenza virus se déroule dans le noyau. Il en est ainsi car ces virus ne possèdent pas d'activité enzymatique de coiffage et de méthylation.

À partir des huit brins d'ARN génomique, dix ARNm sont synthétisés dans le noyau et traduits dans le cytoplasme en sept protéines structurales et trois protéines non structurales.

Les ARN- destinés à être encapsidés pour donner naissance aux futurs virions sont issus de la transcription d'ARN spéciaux identiques en taille aux brins infectants. Ces brins positifs ne sont ni coiffés ni polyadénylés et ne peuvent donc pas être traduits en protéines. En revanche, ils sont copiés directement, engendrant de nouveaux brins de polarité négative qui peuvent ensuite être incorporés dans les particules virales (Josset 2008).

Il est important de noter qu'une copie de chacun des différents segments d'ARN doit au moins être incorporée dans le virion afin qu'il soit infectieux. On ne sait pas comment les jeux complets de segment d'ARN sont sélectionnés mais plusieurs possibilités peuvent être envisagées. Dans le cas d'un processus aléatoire d'incorporation, la proportion de particules virales contenant les huit segments serait d'environ 10% des particules totales (seuls ces virions sont infectants). Aucun complexe nucléoprotéique permettant de lier les différents segments d'ARN viral comme un chapelet et de les incorporer dans les nucléocapsides naissantes n'a été mis en évidence. L'hypothèse la plus communément admise est que les virus influenza présentent une flexibilité structurale leur permettant d'incorporer plus de huit segments d'ARN. Les plus grands virions peuvent contenir plus de 15 segments. La probabilité d'incorporer au moins un jeu complet de segment d'ARN est ainsi beaucoup plus grande. (Schaechter 1999)



1. Liaison du virus avec la membrane cellulaire
2. Entrée du virus dans la cellule
- 3/4. Fusion de la membrane du virus et libération de son ARN
5. Introduction des ARN viraux dans le noyau de la cellule infectée
6. Production des protéines virales par la cellule
7. assemblage de nouveau virion et expulsion

* *Figure N°9 : Les différentes étapes du cycle d'un influenza virus.*

3.1.2. La réponse immunitaire anti-influenza

3.1.2.1. La réponse immunitaire non spécifique

Dans un premier temps, une réponse immunitaire non spécifique se met en place de façon très précoce. Cette réponse représente une protection efficace, mettant en jeu une série de mécanismes permettant de reconnaître précocement et d'inhiber les agents infectieux ainsi que les cellules infectées. Elle est particulièrement importante dans le cas des influenza virus, du fait de leur capacité à muter et à échapper à la réponse spécifique.

Lors d'infection par une nouvelle souche, il faut environ 5 à 7 jours pour que les AC neutralisants et les LT arrivent dans le poumon. Par ailleurs, on observe que dans la plupart des cas, le virus reste confiné dans l'appareil respiratoire superficiel malgré sa capacité à se propager plus largement. La réponse immunitaire non spécifique est donc primordiale pour limiter la progression du virus dans les poumons en constituant une première ligne de défense. Elle contribue également à l'activation et à l'orientation de la réponse immunitaire spécifique, primordiale en termes de vaccination.

Cette immunité non spécifique fait intervenir les défenses de l'appareil respiratoire et peut être définie en quatre temps :

1. inhibition initiale et prévention d'une inflammation excessive permise par des protéines solubles présentes dans la salive et le mucus (ex : mucines, pentraxines, collectines, complément et IgM naturel)
2. détection de l'infection par des récepteurs solubles ou cellulaires (interférons de type 1, cellules dendritiques)
3. déploiement d'effecteurs pour limiter l'infection et prévenir la dissémination (cellules NK, macrophages, neutrophiles)
4. recrutement et orientation de la réponse spécifique

(White 2008)

Le complément : il intervient dans les réponses spécifique et non spécifique et se traduit dans les deux cas par l'opsonisation (facilitation de la phagocytose), la formation de complexe d'attaque des membranes (destruction des cellules infectées) et le chimiotactisme (recrutement des effecteurs du SI).

C'est un composé présent dans le liquide interstitiel alvéolaire. Il participe à la réponse non spécifique anti-influenza via la voie classique d'activation par les IgM naturelles (nIgM). Ce type d'immunoglobuline est largement produit par les LB1 présents en grande quantité dans le poumon et produisant des nIgM indépendamment de la présentation d'un antigène, même chez les individus naïfs. (Baumgarth 2000)

Par ailleurs, C3 et C5 jouent un rôle important dans le recrutement des LT vers le poumon et l'activation en LT CD8+ spécifiques. (Kim 2004)

Les interférons : ils jouent un rôle important lors de l'infection par un influenza virus. Ils induisent un statut « anti-viral » sur les cellules et potentialisent la réponse des cellules effectrices des immunités innée et adaptative.

Les interférons sont des effecteurs antiviraux très efficaces et largement produits chez les cellules immunisées avec un virus influenza inactivé, cependant il est maintenant connu que certaines souches d'influenza virus sauvages sont de mauvais inducteurs de l'excrétion d'interférons. Ce potentiel inhibiteur est supporté par le gène NS1, la protéine NS1 étant la protéine non structurale la plus exprimée à la surface des cellules infectées. Il s'exprime principalement chez l'espèce cible de la souche sauvage, cependant de par les réassortiments entre souches, il semble qu'une souche aviaire acquérant le gène NS1 d'une souche humaine puisse à la suite de cette mutation inhiber la sécrétion d'interférons chez l'homme et se propager efficacement au sein de cette nouvelle espèce. (Garcia 2006)

En l'absence d'inhibition, dès qu'une cellule est infectée, elle sécrète des interférons qui agissent sur les cellules voisines. Concernant la réponse non spécifique, quatre sortes d'interférons (dit de type I) sont aujourd'hui connus ; les deux principaux sont les IFN α et β . L'IFN γ (seul représentant du type II) sera abordé ultérieurement car il est impliqué dans la réponse immunitaire spécifique.

Les cellules infectées détectent l'intrusion virale par la modification de leur surface et par la présence de matériel génétique viral dans leur cytoplasme. En quelques minutes seulement, elles produisent et excrètent des IFN de type I, qui agissent de façon différente selon la nature de la cellule cible.

Les IFN α/β agissent sur la cellule qui les a produits (effet autocrine) et provoquent différentes modifications – synthèse d'une protéine-kinase inhibant la synthèse protéique y compris virale, synthèse de la 2'5'-oligoadénylate-synthétase activant une endonucléase latente capable de dégrader l'ARN viral, blocage les polymérases virales... – pour stopper la

machinerie cellulaire et rendre les cellules infectées réfractaires à la multiplication virale. Si la cellule est trop infectée, cela peut déclencher son apoptose.

Ils agissent également sur les cellules environnantes appartenant ou non au système immunitaire (effet paracrine). L'interaction de l'interféron avec son récepteur sur une cellule saine n'appartenant pas au système immunitaire (SI) lui permet de résister à l'infection et augmente l'expression des molécules de classe I du CMH afin d'optimiser la présentation des peptides viraux et leur reconnaissance par le SI. Cet effet paracrine s'exprime aussi par l'activation des cellules NK et des macrophages, ce qui potentialise la réponse non spécifique. (Cavaillon 1996)

On peut noter que, bien que faisant partie du type I, les IFN β interviennent aussi dans la réponse spécifique en induisant la maturation des cellules dendritiques (DCs) indispensables à cette dernière, comme nous le verront plus loin.

Les cellules NK : ce sont des lymphocytes de grande taille, possédant de nombreuses granules contenant des perforines, des granzymes ou des cytokines. Leur rôle est de reconnaître et de tuer les cellules infectées de façon précoce en attendant la mise en place de la réponse immunitaire spécifique.

Lors de l'infection par un influenza virus, l'activation des cellules NK passe notamment par la présentation des HA sur la surface des CD8. Ces HA interagissent avec des récepteurs non spécifiques d'un antigène (NKp44, NKp46) – contrairement aux LT et LB – ce qui a pour conséquence de potentialiser l'activation des cellules NK (Draghi 2007). Toutes les souches n'interagissent pas avec les mêmes récepteurs ; par exemple, le récepteur NKp44 s'accroche à toutes les souches humaines mais seulement à la souche H5N1 des influenza virus aviaires. Par ailleurs, certaines souches humaines récemment isolées semblent moins sensibles à la lyse par les cellules NK, de par une augmentation de la glycosylation des HA réduisant leur affinité avec les récepteurs NK. (Owen 2007)

Le contrôle de leur activité cytolytique afin d'éviter la destruction de cellules saines se fait grâce à plusieurs récepteurs, activateurs ou inhibiteurs, qui leur sont propres et qui interagissent avec les molécules de classe I du CMH. Il y a également des récepteurs Fc qui interviennent dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. (Schleinitz 2006)

3.1.2.2. La réponse immunitaire spécifique

La réponse spécifique est plus longue à se mettre en place. Elle constitue la seconde ligne de défense de l'organisme en le nettoyant des pathogènes ayant échappé à la réponse non spécifique. Elle permet aussi la mise en place de la « mémoire immunologique » permettant à un individu de lutter rapidement et efficacement contre une souche déjà rencontrée. C'est ce mécanisme de mémoire qui est recherché lors d'une vaccination.

La mise en place de la réponse spécifique : les CPA font le lien entre les réponses non spécifique et spécifique. Chaque cellule possède un assortiment plus ou moins original de TLR (Toll Like Receptor) mais ils sont exprimés majoritairement par les CPA (en surface ou dans leur cytoplasme).

Ces TLR sont des protéines spécialisées dans la reconnaissance de molécules exprimées par les micro-organismes, les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Ce sont des protéines, des lipides, ou même des acides nucléiques très conservés entre les différents micro-organismes, toujours différentes des molécules du soi et ne correspondant jamais à des toxines sécrétées. Les agents d'un même groupe viral, d'une même famille bactérienne ou encore protozoaire, vont exprimer un même type de PAMP.

Une fois que le TLR a reconnu le PAMP, une réponse inflammatoire ayant pour but de prévenir le SI commence. Par exemple, les TLR3 et 7 reconnaissent les ARN viraux libérés dans le cytoplasme suite à l'acidification des vésicules d'endocytose des cellules infectées. (Wang 2006)

La reconnaissance du type de micro-organisme par les CPA (*via* le type de PAMP) permet d'orienter directement le profil de la réponse immunitaire.

De cette manière, les CPA expriment les Ag des cellules infectées ou des virus libres et émettent des signaux qui vont recruter les lymphocytes B naïfs et des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Toutes ces cellules (CPA, LB, LT) reçoivent également des signaux permettant leur migration vers les nœuds lymphatiques. C'est à ce niveau que les CPA présentent l'Ag *via* le CMH-I et le CMH-II. Cela entraîne l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et la production d'IL-12 responsables de la différenciation des LT CD4+ en LT spécifiques du virus. Ce LT devient le chef d'orchestre de la réponse immunitaire et permet aux LB de se différencier en plasmocytes producteurs d'AC ayant une grande affinité pour le virus. (Guebre 2003)

La réponse à médiation humorale : une fois tous les effecteurs activés, une réponse à médiation humorale, active sur les particules virales libres et sur les cellules infectées, se déclenche. Elle met en jeu en petite partie l'activation directe du complément, qui peut léser l'enveloppe (virolyse). Cependant, cette réponse humorale implique majoritairement les AC neutralisants (ACn) produits par les lymphocytes B (les particules virales saturées d'AC ne peuvent plus interagir avec leur récepteur cellulaire). On en distingue deux types, les AC sécrétoires (IgA) transportés vers la surface apicale des cellules épithéliales pulmonaires après internalisation dans une vésicule d'endocytose au niveau de la membrane basale et les AC sériques préformés (IgG) transsudant du sérum vers la membrane apicale par diffusion (Tamura 2005). Ces AC peuvent être produits contre n'importe quelle protéine virale de la cellule infectée, cependant ce sont les glycoprotéines de surface qui sont majoritairement reconnues par le CMH II. Ainsi le complexe peptide-CMH II est reconnu par les LT CD4+ ce qui déclenche la production d'AC en grande majorité anti-HA et anti-NA. (Tulp 1994)

Les ACn anti-HA neutralisent l'infectiosité du virus tandis que les ACn anti-NA empêchent les cellules infectées de libérer de nouveaux virions. Ces AC neutralisants sont particulièrement efficaces en cas de virémie, cependant ils sont spécifiques d'un sous-type, voire d'une souche d'influenza virus. (Johansson 1989)

Des ACn anti-M2, non spécifiques d'une souche donnée, sont également produits mais en très faible quantité. (Black 1993)

Des AC anti-M1 et anti-NP ont également été isolés mais ils ne semblent pas être protecteurs. (Murphy 1989)

Cible	Agent	Mécanisme
Virus libre	AC seul	* Bloque la fixation à la cellule * Bloque l'entrée dans la cellule * Bloque le déshabillage du virus
	AC et complément	* Disloque l'enveloppe virale * Bloque le récepteur viral
Cellule infectée par un virus	AC et complément	* Lyse les cellules infectées * Opsonisation du virus ou des cellules pour la phagocytose
	AC lié aux cellules infectées	* Cytotoxicité cellulaire AC-dépendante par les cellules NK, les macrophages et les neutrophiles

❖ **Tableau N°6 : Bilan des effets antiviraux des anticorps (Roitt 2002)**

La cytotoxicité cellulaire : l'immunité anti-influenza a été par le passé exclusivement associée à la réponse humorale avec une bonne corrélation *in vitro* entre le taux d'AC et la protection clinique (De Jong 2003). On sait aujourd'hui que l'immunité cellulaire est protectrice même en absence d'AC et que, notamment chez les personnes âgées, l'évaluation de la réponse cellulaire à une meilleure valeur prédictive de la protection clinique que la mesure de la réponse humorale. (McElhaney 2009)

Afin d'éliminer tous les réservoirs de virus, les cellules infectées sont détruites soit par phagocytose, soit par lyse cellulaire *via* les cellules NK ou les lymphocytes T cytotoxiques (LTc). Les cytokines-clés dans cette réponse sont l'IFN γ , important pour l'activation des monocytes, le facteur de nécrose tumorale (TNF α), et le granzyme B (Ewen 2003). Le TNF α a plusieurs activités antivirales, notamment :

1. la mort cellulaire par apoptose suite à l'interaction avec le récepteur du TNF ;
2. l'induction des mécanismes de défense intracellulaire suscités par l'interféron. En présence d'IFN γ , les LT CD8⁺ deviennent des LT cytotoxique (LTc).

Les LTc vérifient le complexe peptide-CMH type I de chaque cellule et détruisent celles présentant les Ag viraux par libération de perforines et de granzymes dans la seconde suivant le contact. La surveillance antivirale assurée par les cellules T est hautement sélective et très efficace. Les cellules T cytotoxiques CD8⁺, restreintes par les molécules de classe I du CMH, se concentrent au site de réplication virale et détruisent les cellules infectées. Dans la mesure où toutes les cellules de l'organisme, ou presque, expriment des molécules de classe I du CMH, ce mécanisme est déterminant pour l'identification et l'élimination des cellules infectées. La quasi-totalité des protéines virales peut être dégradée en peptides transportés du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique où ils s'associent à des molécules de classe I du CMH. Un avantage pour l'hôte est que les protéines produites précocement lors du cycle de réplication peuvent être apprêtées et présentées aux cellules T bien avant que les protéines virales complètes aient été produites. Parmi tout les Ag des influenza virus, ce sont les Ag internes qui sont les plus stimulantes pour les LTc, NP étant le plus fort. Dans la mesure où la structure de ces Ag est conservée quelque soit la souche, l'immunité cellulaire anti-influenza n'est pas vraiment spécifique d'un sous-type ou d'une souche virale. (Yewdell 1985)

La mémoire immunitaire : lors d'une primo-infection par un influenza virus, cette mémoire peut se mettre en place *via* la réponse immunitaire cellulaire (LT cytotoxique) et la réponse immunitaire humorale (AC neutralisant).

Cette réponse spécifique est relativement longue à se mettre en place (environ une semaine), à la suite de laquelle une petite partie des lymphocytes T CD4, T CD8 et des lymphocytes B forme des lymphocytes mémoires. Ces lymphocytes mémoires se divisent peu, ce qui augmente leur durée de vie. Quand ils rencontrent à nouveau l'agent pathogène, une petite partie reste des lymphocytes mémoires tandis que le reste se transforme en effecteurs. Ainsi a-t-on presque toujours des lymphocytes mémoires : leur stock ne s'épuise pas s'ils sont stimulés régulièrement. Néanmoins, en l'absence de stimulation, on peut aboutir à leur disparition progressive. La circulation des lymphocytes mémoires est extrêmement contrôlée : ils n'ont pas besoin d'aller dans les nœuds lymphatiques et patrouillent dans tous les tissus de l'organisme à la recherche de l'Ag.

Les épitopes antigéniques des LTc sont généralement moins variables que ceux des ACn, ainsi on observe que les vaccins ciblant la réponse immunitaire cellulaire permettent une meilleure protection croisée entre différents souches. Bien qu'ils réduisent la sévérité et la progression de l'infection, ils n'éliminent pas complètement le virus. *A contrario*, les vaccins orientant vers la réponse humorale offre la meilleure protection contre les influenza virus, mais une protection spécifique de quelques souches seulement. Actuellement, les vaccins utilisés ciblent largement sur la reconnaissance des HA et induisent une réponse immunitaire dépendante des ACn. (Takahashi 2007)

3.1.2.3. Etude bibliographique de l'immunité induite par M2

Le potentiel immunogène du peptide M2 est étudié depuis la fin du XXème siècle et son immunité antivirale est démontrée pour la première fois *in vitro* en utilisant des AC monoclonaux de souris dirigés contre M2e (Zebebee 1988). On prouve alors que l'administration passive de ces AC (14C2) associés à un adjuvant de Freund réduit la charge virale dans les poumons des souris infectées par un virus influenza virus A (Treanor 1990).

En 1995, la protéine M2 partiellement purifiée, utilisée directement comme antigène, se révèle efficace pour réduire la mortalité et la réplication virale chez les souris contaminées par une souche d'influenza A. Des AC anti-M2 sont mis en évidence et impliqués dans le processus immunitaire. Contrairement à l'étude précédente, le transfert de sérum à des souris naïves ne confère pas ici de protection clinique (Slepushkin 1995)

À partir de 1999, à la suite de Neiryck, plusieurs vaccins associant le peptide M2e à un élément promoteur sont testés (cf tableau N°X). Les deux vaccins testés par sont constitués du peptide M2e associé au core du virus de l'hépatite B (HBc). Sur les protéines finales, il vérifie que l'épitope M2e est bien exprimé en surface de la structure tridimensionnelle.

Suite à l'administration intrapéritonéale de ces protéines adjuvées, il observe une bonne protection clinique, vis-à-vis de souche homologues et hétérologues, associée à une augmentation significative de la concentration sérique en IgG anti-M2e, même si cette concentration reste très inférieure à celle des IgG anti-BHc. De plus, l'injection intrapéritonéale de ces IgG anti-M2e purifiés à des souris naïves les protège lors d'une épreuve de virulence.

Les protéines sont également testées sans adjuvant par voie intranasale selon le même protocole que pour la voie intrapéritonéale. Il observe là aussi une très bonne protection homologue et hétérologue et une concentration sérique en IgG anti-M2 plus élevée que lors de l'immunisation par voie intrapéritonéale.

Les auteurs en déduisent que le peptide M2e peut être utilisé comme antigène vaccinal et que la réponse immunitaire mise en place est une réponse de type humoral impliquant des AC protecteurs, permettant une protection longue contre presque toutes les souches A. Bien qu'ils ne l'aient pas explorée, ils suggèrent que la réponse immunitaire à médiation cellulaire n'intervient pas ou alors de façon mineure. (Neiryck 1999)

En 2004, Jegerlehner utilise la molécule M2e-HBc non adjuvée par voie sous cutanée, en fixant le peptide M2e au domaine le plus immunogène de HBc pour améliorer l'accessibilité des lymphocytes B à l'antigène. Il conclut lui aussi que le vaccin induit l'apparition d'AC protecteurs et que l'implication de l'immunité à médiation cellulaire est négligeable. *A contrario*, il observe une efficacité moindre du vaccin par rapport à l'étude de Neiryck. Pour lui, bien qu'il permette de diminuer les signes cliniques lors d'épreuves de virulence à faible dose, le vaccin M2 testé n'empêche pas l'infection par le virus et ne protège pas efficacement lors d'épreuve de virulence à forte dose avec la souche A/PR/8/34. Il tempère néanmoins ses observations par le choix du protocole d'immunisation (voie et nombre d'injections) et l'absence d'adjuvant.

Concernant les mécanismes immunitaires mis en place, son étude va plus loin en précisant que l'action des AC passe principalement par l'activation de cellules cytotoxiques NK. Le mécanisme impliqué serait donc essentiellement la cytotoxicité AC-dépendante

(CCAD). Cela corrobore l'hypothèse que les AC produits chez les animaux vaccinés sont majoritairement des IgG ainsi que (de façon moins importante) des IgA, et que ces deux isotypes sont les médiateurs principaux de la CCAD chez la souris.

Il conclut également que les AC neutralisants sont peu impliqués et que cela peut expliquer en partie les limites en termes d'efficacité du vaccin en comparaison aux vaccins inactivés actuels utilisant HA comme antigène. (Jegerlehner 2004)

Ainsi, ces études utilisant le peptide M2 purifié associé à une protéine promotrice, adjuvée ou non, par voie intranasale, intrapéritonéale ou sous-cutanée, mettent en évidence l'initialisation d'une réponse immunitaire à médiation humorale impliquant principalement la CCAD et semblant protéger contre l'apparition de signes cliniques à la suite de l'infection par presque toutes les souches de type A.

Cependant, il est également possible d'induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire avec le peptide purifié. En effet, adjuvé avec un sel d'aluminium ou un adjuvant de Freund, le peptide M2e peut stimuler la production cellulaire d'IL4 et d'IFN γ , traduisant l'activation de lymphocytes T spécifiques de M2e. En revanche, contrairement aux AC, l'administration à des souris naïves d'une solution de clones activés de LT Th2 purifiés ne les protège pas mais aggrave les signes respiratoires lors d'épreuve de virulence. (WU 2007)

Le type de réponse immunitaire obtenu dépend non seulement de l'adjuvant utilisé mais également du type de vaccin. Ainsi, en 2001, d'après le principe selon lequel les plasmides d'ADN induisent préférentiellement l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et que cela est une voie de protection efficace en cas d'infection virale, Kenji Okuda teste le potentiel vaccinal d'une solution de plasmides d'ADN contenant les gènes codant pour M1 et M2, de la souche A/PR/8/34. Il observe la mise en place d'une immunité à médiation cellulaire. Lors des épreuves virulentes, une très bonne immunité homologe (souche A/PR/8/34) et hétérologue (souche A/WSN/33) est observée.

Concernant le mécanisme immunitaire, les concentrations en AC sériques anti-M2 sont très faibles. À l'inverse, une forte stimulation des LTc et une augmentation de la production d'IFN γ et d'IL4 par les cellules lymphatiques, notamment dans la rate, est observée quelque soit la voie d'administration. Enfin, l'utilisation d'AC anti-CD4 $^{+}$ et anti-CD8 $^{+}$ permet de conclure que ces deux types cellulaires jouent un rôle majeur dans le

mécanisme protecteur mis en place (augmentation significative du nombre de morts lors d'épreuve de virulence suite à l'injection de l'un de ces AC). (Okuda 2001)

De façon générale, les essais de vaccination utilisant le transfert passif de gène ou des vecteurs viraux exprimant M2 permettent de s'affranchir de l'étape lourde de purification du peptide et l'étude de la réponse immunitaire cellulaire anti-M2 (Tompkins 2007).

M2 contient des épitopes pouvant stimuler les LTc, cette réponse cellulaire s'étant révélée protectrice chez des souris et des furets (Lalor 2008).

Antigen	Vaccine type	Carrier	Type of antigen
M2	Protein		Human
	DNA vaccine		Human, avian
	Adenoviral vector		Human, avian
M2e	Peptide		
M2e	Virus-like particle	HBVc	
		PaMV	
		HPV	
		Q β	
		-/GST	Human
M2e	Protein	CTA1-DD	Human
		KLH	Human, avian
		tGCN4	Human
		Synthetic multiantigenic carrier	Human
M2e	Synthetic	Liposome	Human, avian
		NP	Human, avian

HBVc: Hepatitis B virus core; HPV: Human papillomavirus; KLH: Keyhole limpet hemocyanin; M2: Matrix protein 2; M2e: M2 external domain; PaMV: *Petunia asteroid mosaic tobamovirus*; tGCN4: Transgenic general control nondepressible-4.

❖ **Tableau N°7 : Aperçu des différents types de vaccins testés utilisant M2. (Schotsaert 2009)**

(Les efficacités mises en évidence sont très différentes, y compris entre plusieurs vaccins de même type.)

Ces différentes études mettent donc en exergue une immunité protectrice induite par la protéine M2, pouvant être à médiation tantôt cellulaire tantôt humorale. Il faut noter qu'au sein de toutes ses études, certains facteurs sont différents – tel que la présence ou non de

protéine promotrice, la présence ou non d'adjuvant, la voie d'administration et le type de vaccin – et explique l'orientation Th1 ou Th2 de la réponse mise en place.

Comme on l'a expliqué précédemment, en cas d'infection virale, l'utilisation d'un vaccin induisant une réponse de type cellulaire est préférable car il est plus proche de la réponse obtenue naturellement. Il faut cependant garder à l'esprit qu'en présence de virus entier, la réponse anti-M2 reste négligeable par rapport à l'immunité dirigée contre les glycoprotéines de surface HA et NA. (Rimmelzwaan 2004)

3.2. La vaccination

3.2.1. Principes de bases de la vaccination

L'objectif de la vaccination est double. Au niveau individuel, elle vise à empêcher l'infection par un agent pathogène donné ou au moins d'empêcher les manifestations cliniques de la maladie. À l'échelle d'une population, elle permet de réduire les risques d'épidémie en limitant la circulation de l'agent pathogène. (Wicker 2009)

Le principe de base de la vaccination consiste à présenter au système immunitaire l'agent pathogène atténué ou des antigènes ciblés de l'agent pathogène en question. Les défenses immunitaires ainsi « stimulées » par le vaccin préviennent une attaque de l'agent pathogène pendant une durée pouvant varier d'un vaccin à l'autre. Cela repose sur deux caractéristiques essentielles du système immunitaire :

- sa spécificité, qui lui permet de faire la différence entre les différents agents pathogènes et entre les différents antigènes d'un même agent ;
- sa mémoire, qui lui permet de réagir plus rapidement et plus efficacement lors de la détection d'un antigène rencontré ultérieurement.

En outre, les vaccins ne sont pas efficaces dans tout les cas. S'il s'agit d'infection aiguë suivie de guérison possible avec mise en place d'une immunité naturelle, alors il y a de bons espoirs de mettre au point un vaccin efficace. Il en est de même pour les infections aiguës mortelles (pour exemple le vaccin anti-rabique). Cependant, pour les infections chroniques latentes - où le système immunitaire n'est pas capable de mettre en place une réponse efficace et pour les infections ne permettant pas la mise en place d'immunité naturelle - la protection *via* la vaccination a peut de chance de fonctionner car il est très difficile de fabriquer un vaccin meilleur que l'immunité naturelle. Ces différents profils dépendent des facteurs de virulences, c'est pourquoi il faut connaître la pathogénie du micro-organisme avant de se lancer dans la mise au point d'un vaccin. (Kim 2010)

Un autre point essentiel sur lequel il faut se pencher est l'orientation de la réponse immunitaire que l'on veut induire. Elle doit être plutôt de type Th1 pour les agents pathogènes intracellulaires et plutôt de type Th2 pour ceux extracellulaires. Les réponses Th2 sont relativement faciles à mettre au point. Pour la réponse Th1, qui est la plus efficace en cas

d'infection virale, il faut mimer l'entrée de l'agent pathogène dans la cellule et il est donc dans ce cas nécessaire d'utiliser des vaccins atténués ou des adjuvants adaptés.

De façon plus précise il est intéressant de savoir si la protection conférée par le vaccin dépend des AC sécrétoires, des AC sériques préformés, des Ac rapidement induits par ré-exposition au pathogène ou bien des lymphocytes Tc CD8+. Par ailleurs, il faut s'interroger sur le rôle de la classe d'anticorps, de leur affinité et des réponses T (CD4+ et CD8+) dans la protection et dans l'immunopathologie. Selon les réponses apportées à ces questions, on cherchera à induire des AC sécrétoires plutôt par une immunisation par voie muqueuse, des AC sériques par une immunisation parentérale avec des induction de mémoires ou bien une vaccination permettant une présentation d'antigènes peptidiques par la voie des molécules de classe I du CMH.

In fine, on aura très souvent une production d'anticorps à la suite de la vaccination mais il y a quelques exceptions telles que la vaccination antituberculeuse avec la souche vaccinale dite « Bacille de Calmette et Guérin (BCG) » qui met en jeu une réaction à médiation cellulaire. (Watanabe 2006)

Lorsque des AC sont produits, leurs concentrations diminuent progressivement dans un délai plus ou moins long ce qui peut fixer la durée d'efficacité du vaccin. Cette production d'AC est mesurable et peut être utilisée dans certains cas pour savoir si le sujet est correctement vacciné (par exemple dans le cas de la rage). Cependant, dans la grande majorité des cas, il n'y a pas de corrélation entre les taux d'AC et le niveau de protection chez l'animal. Cela vient du fait que l'on mesure les AC dans leur globalité alors que seuls quelques isotypes sont efficaces. De plus, cela ne permet pas d'estimer la réponse cellulaire.

Enfin, pour tout vaccin, il est essentiel d'en évaluer l'efficacité. Il faut évaluer la protection clinique lors d'une épreuve de virulence mais également caractériser la protection mise en place au niveau humoral et/ou cellulaire selon les objectifs du vaccin. Ces méthodes d'évaluations doivent être adaptées. En effet, selon l'orientation de la réponse recherchée, le dosage des AC n'est pas forcément significatif. Il faut alors se baser sur la recherche d'autres effecteurs intervenant dans la mise en place d'une immunité de type cellulaire.

Par ailleurs, lors de toute évaluation d'efficacité, il ne faut pas négliger les variations interindividuelles mises en évidence par le fait que, dans une population d'individus vaccinés,

il en reste toujours quelques uns non immunisés. Ces variations résultent en faite de plusieurs facteurs :

- la diversité allélique du CMH qui fait que, pour un même agent pathogène, tous les individus ne présentent pas les mêmes antigènes ;
- la capacité intrinsèque du système immunitaire d'un individu à s'orienter préférentiellement vers une réponse de type Th1 ou Th2 ;
- l'état général de l'individu et la présence éventuelle d'infections intercurrentes au moment de la vaccination.

3.2.2. Les différents types de vaccins

Les vaccins sont habituellement inoculés par injection mais ils peuvent l'être par voie orale ou nasale. Il existe deux grands types de vaccins - atténués et inactivés - mais au delà de cette dichotomie simpliste, il existe de nombreuses sortes de vaccins différents, surtout depuis l'utilisation du génie génétique.

Bien que les réassortiments viraux chez le porc aient été considérés comme la source majeure de nouveau virus influenza pathogène pour l'homme, on sait aujourd'hui que le risque vient principalement des mutations et des recombinaisons des virus aviaires (Lutticken 2007). C'est pourquoi, nous allons ici présenter les différents types de vaccins proposés en élevage aviaires.

Jusqu'en 2000, la vaccination contre l'influenza aviaire à déclaration obligatoire était déconseillée et n'a été appliquée que dans de très rares foyers, en appui aux mesures de lutte et sans objectifs d'éradication. Des études portant sur les programmes de vaccination ont été conduites dans différents pays et, compte tenu de la propagation sur trois continents de la souche asiatique H5N1 du virus hautement pathogène, la vaccination est maintenant appliquée à grande échelle.

Les vaccins actuellement disponibles protègent efficacement contre l'apparition des signes cliniques et la mortalité. Il apparait que les individus vaccinés résistent à une charge virale beaucoup plus importante que les individus non vaccinés. Même si la vaccination réduit significativement mais pas complètement l'excrétion de virus, les données expérimentales et de terrains semblent prouver que si toutes les exploitations à risque sont correctement

vaccinées les individus n'excrèteront pas assez de virus dans l'environnement pour infecter des animaux vaccinés. (Capua 2007)

Voyons donc les différentes sortes de vaccins disponibles actuellement :

- Les vaccins inactivés :

Les vaccins possédant actuellement une licence sont majoritairement des vaccins inactivés. La majorité des vaccins actuels, tout comme les premiers vaccins, sont fabriqués à partir de souches faiblement pathogènes. Pour cela des souches de terrain sont cultivés sur œufs embryonnés de 9 à 11 jours, puis inactivé chimiquement. Les vaccins utilisent ensuite les virus entier ou une solution de HA purifiés associés à un adjuvant huileux.

Il faut noter que quelques vaccins utilisent des souches hautement pathogènes telles les souches HPAI H7N3 au Pakistan et H5N1 en Indonésie.

Plus récemment, des procédures génétiques inversées ont été développées afin de permettre la fabrication de gènes hautement pathogènes génétiquement modifiés (en changeant le site de division protéolytique de l'hémagglutinine hautement pathogène en faiblement pathogène) pour une production massive et sûre. (Swayne 2009)

Il y a une grande variété de vaccins inactivés mais l'immunogénicité est basée pour tous sur la présentation d'une hémagglutinine du même type que la souche sauvage détectée sur le terrain. Dans le cas d'émergences de nouvelles épidémies aviaires, ce sont généralement des vaccins inactivés qui ont été produits. Par exemple, en 2000, une épidémie due à une nouvelle souche H7N1 LPAI a été endiguée par l'utilisation d'un vaccin inactivé adjuvé (par une émulsion eau-huile) de type H7N3, permettant de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés. Cela a rendu possible la mise en place d'une stratégie vaccinale DIVA réfléchi, associée à un programme de sérosurveillance intensif sur des animaux sentinelles et des animaux vaccinés. De même, à Hong Kong, depuis 2003, plus aucune circulation de virus H5N1, responsable de plusieurs épidémies par le passé n'a été mise en évidence. La maîtrise de cette souche HPNIA est intervenue environ un an après l'abattage de 1,3 million de poulets et la mise en place d'un programme de vaccination basé sur une double administration à quatre semaines d'intervalle d'un vaccin inactivé hétérologue H5N2.

Les vaccins inactivés présentent une innocuité parfaite, peuvent servir de marqueurs, et sont à la fois moins chers et plus faciles à produire (en particulier si la production se fait par

synthèse chimique). Cependant, leur purification n'est pas toujours facile, et ils sont peu immunogènes en l'absence d'adjuvant. Cela est particulièrement vrai pour les vaccins peptidiques où l'épitope est tellement petit qu'il doit en plus de l'adjuvant être associé à une protéine porteuse. Par ailleurs leur utilisation ne peut se faire qu'individuellement par voie injectable, ce qui nécessite une charge de travail importante.

- Les vaccins vivant :

Les vaccins vivants sont en général plus efficaces que leurs homologues inactivés car ils stimulent fortement le système immunitaire avec un profil similaire à celui d'une infection naturelle. On distingue les vaccins vivants atténués des vaccins à vecteur recombinants.

Les vaccins atténués ne sont pas utilisés car leur conservation est difficile et une légère virulence résiduelle persiste toujours (risque de réversion).

Il existe deux vaccins aviaires à vecteur recombinant. A ce jour ils ne sont utilisés que dans les pays ayant une AMM, à savoir le Salvador, le Guatemala, le Mexique et les USA, et ont notamment prouvé leur efficacité lors de la campagne de vaccination contre H5N2 (vaccin pox aviaire IA-H5). (Swayne 2009)

Ils sont constitués d'un vecteur viral dans lequel on insère le gène codant l'hémagglutinine du virus influenza ciblé. Les vecteurs qui, à ce jour, ont été utilisés pour les vaccins commercialisés sont des *Poxviridae* (genre *Avipoxvirus*, virus de la variole aviaire) et des *Paramyxoviridae* (genre *Parainfluenzavirus*, virus de la maladie de Newcastle). On peut noter que le virus de la maladie de Newcastle étant à ARN négatif non segmenté, on doit utiliser la génétique inverse qui est un procédé beaucoup plus lourd et plus complexe que celui employé lors de l'utilisation du virus de la variole aviaire.

Ces vaccins présentent plusieurs avantages :

- ils peuvent induire une réponse efficace à la fois humorale et cellulaire
- ils peuvent être administrés à de jeunes individus et induire ainsi une immunité précoce
- ils peuvent constituer des vaccins marqueurs, essentiels pour distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés
- ils sont peu dangereux à créer car on ne manipule pas l'agent pathogène mais uniquement son génome

- ils sont faciles à conserver car les vecteurs utilisés sont relativement stables à la chaleur et résistants au milieu extérieur.

Outre ces avantages, ils possèdent également quelques inconvénients :

- ils n'induisent qu'une immunité partielle chez les oiseaux ayant déjà été exposés au virus vecteur, car le SI en limite la réplication
- ils ne peuvent être utilisés que dans les espèces pour lesquelles une efficacité a été démontrée (barrière d'espèce possible).
- ils présentent un risque d'infection lié au vecteur si l'hôte y est sensible, notamment pour les immunodéprimés, et de recombinaison si la cellule est infectée au même moment par un virus proche (car c'est un virus qui se réplique dans l'individu à vacciner).
- il a été prouvé que ce type de vaccin protégeait efficacement contre toutes les souches possédant le même type d'hémagglutinine, mais pas contre celles dont le type diffère.

- Les vaccins intermédiaires

Il s'agit des vaccins à ADN. Ils ne sont pas utilisés à l'heure actuelle dans le cadre de la lutte contre les influenza virus et demeurent uniquement expérimentaux.

4. LE VIRUS MYXOMATEUX : UN VECTEUR VACCINAL ?

4.1. Présentation générale du virus myxomateux

4.1.1. Classification

Le virus de la myxomatose fait partit de la famille des *Poxviridae*. C'est à partir de considérations morphologiques, des espèces animales cibles et de l'existence de protection croisée que s'est établit la classification de cette famille.

Elle se divise en deux sous-familles dont les membres infectent soit les vertébrés, pour la sous-famille des *Chordopoxvirinae*, soit les invertébrés, pour la sous-famille des *Entomopoxvirinae*. La sous-famille des *Chordopoxvirinae* se subdivise elle-même en 8 genres dont le détail est décrit dans le tableau n°8.

GENRE	Espèce type	Principales autres espèces
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la vaccine	Mousepox (ectromélie) <i>Cowpoxvirus</i> Virus de la variole du chameau Virus de la variole du singe Virus de la variole humaine <i>Raccoonpoxvirus</i> <i>Taterapoxvirus</i> <i>Volepoxvirus</i>
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orfivirus</i>	Virus de la stomatite papuleuse des bovins <i>Pseudocowpoxvirus</i> Squirrel <i>parapoxvirus</i> <i>Parapoxvirus</i> of red deer in New Zealand
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille + virus spécifiques de plusieurs espèces d'oiseau
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine Lumpy skin disease virus
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose	Virus du fibrome de Shope Virus du fibrome malin du lapin Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus du <i>Molluscum contagiosum</i>	
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapoxvirus</i> de l'Homme	Virus Yaba de la tumeur du singe

❖ *Tableau N°8 : Classification des Chordopoxvirinae et place du virus myxomateux. (Van Regenmortel 2000)*

4.1.2. Structure

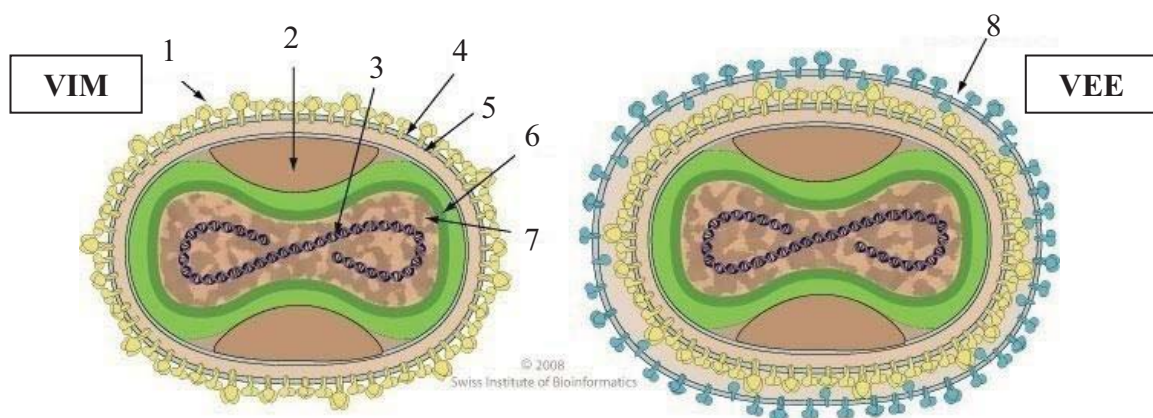
Le genre *Poxvirus* fait partie des virus animaux connus pour être les plus gros et les plus complexes. Concernant le genre *Leporipoxvirus*, les virions sont de forme rectangulaire et mesurent, $300 \times 250 \times 200 \text{ nm}^3$. (Fleury 2009)

Ces virus sont entourés d'une membrane composée de phospholipides et de protéines et tapissée d'éléments tubulaires arrangés de façon aléatoire. Sa composition est différente de celle de la cellule et elle possède au moins douze polypeptides dont 6, tels que M022 (membrane extracellulaire) et M071 (membrane intracellulaire), sont exposées aux anticorps. (Muller 2010, Zachertowska 2006)

En réalité, deux formes virales infectieuses coexistent (cf figure n°10) :

- les virions intracellulaires matures (VIM) constituent la forme virale majoritaire. Ils ne possèdent qu'une seule membrane et sont très résistants. Ils restent pour la plupart séquestrés dans le cytoplasme jusqu'à la lyse de la cellule hôte et semblent intervenir dans la dissémination virale entre individus.

- les virions extracellulaires enveloppés (VEE) sont issus de l'évolution d'une toute petite fraction des VIM par acquisition d'une enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi. Ils peuvent migrer vers la surface de la cellule et sont impliqués dans la dissémination du virus au sein de l'organisme de l'individu infecté, la fusion avec la membrane de la cellule hôte leurs permettant d'être libérés directement dans le milieu extracellulaire. (Duteyrat 2002)



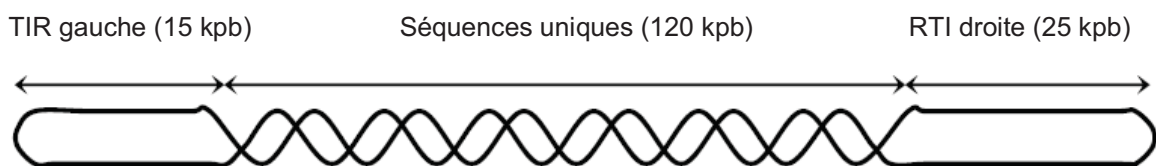
* **Figure N°10 : Le virus myxomateux sous ses deux formes : virion intracellulaire mature (VIM) et virion extracellulaire enveloppés (VEE). (Viral Zone 2009)**

1 = polypeptides de surface, 2 = Corps latéraux, 3 = ADN bicaténaire, 4 et 5 = parties intérieure et extérieure de la membrane interne, 6 = Membrane du core, 7 = Core, 8 = Membrane externe.

Les poxvirus possèdent un ADN bicaténaire unique, dont la taille varie de 130 kpb chez les *parapoxvirus* à 300 kpb pour les *avipoxvirus*, codant pour plus de 150 protéines et dont les extrémités sont liées de façon covalente en épingle à cheveux (cf figure n°11). (Broyles 2003)

Au sein de ce génome on distingue trois régions :

- la région terminale gauche, également appelée répétition inversée terminale (RIT). Elle contient neuf gènes codant pour des facteurs de virulence et numérotés de T1 à T9 en fonction de leur position par rapport à la boucle terminale ;
- la région centrale, fortement conservée, correspondant aux gènes essentiels pour le cycle viral ;
- la région terminale droite, image miroir de la RIT gauche ;



* **Figure N°11 : Génome des virus du genre Poxvirus**
Vue schématique du génome du virus de la vaccine (proportions non respectées)

4.1.3. Le cycle viral

Il faut noter que les *Poxvirus* ont un mode de répllication spécifique. Ce sont des virus à répllication intracytoplasmique, ce qui signifie que l'ADN ne pénètre jamais dans le noyau de la cellule infectée.

Comme on l'a vu, il existe deux types de virions auxquels sont associées deux modalités différentes de pénétration cellulaire. Pour les VIM, l'entrée dans la cellule se fait par fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire tandis que pour les VEE, elle se fait par endocytose. Dans ce deuxième cas, l'enveloppe externe est désagrégée par le pH acide des vésicules d'endocytose puis la membrane virale interne fusionne avec la membrane de la vésicule. (Vanderplasschen 1998).

Dans les deux cas, on aboutit à la libération du noyau viral dans le cytoplasme et trois séries d'ARNm interviennent pour que se déroule un cycle complet.

En premier lieu, des ARNm précoces sont traduits afin que la répllication de l'ADN viral commence. Il faut noter que les liaisons covalentes présentes aux extrémités du génome, ainsi que les régions terminales répétées inversées, imposent un mode de répllication particulier. Ces ARNm précoces codent pour des éléments essentiels à la répllication de l'ADN, à savoir :

- des protéines modulant la réponse immunitaire ;
- des enzymes et des cofacteurs nécessaires au processus de répllication de l'ADN et au métabolisme des nucléotides (ADN-polymérase codée par le virus) ;
- des facteurs nécessaires au déroulement de la phase de transcription intermédiaire qui a lieu sur l'ADN nouvellement synthétisé.

Durant la phase de répllication du génome (phase d'éclipse), des ARNm issus de la transcription intermédiaire codent à leur tour pour des facteurs nécessaires à la phase de transcription tardive, ainsi que pour les protéines de structure (dont M022 et M071).

Enfin, les derniers ARNm synthétisés vont coder pour d'autres protéines de structures et des enzymes permettant leur assemblage. Ils vont également coder pour des facteurs de transcription précoces, qui, intégrés aux nouveaux virions, permettront la première transcription de ces particules virales. (Roberts 2008)

4.2. Utilisation des poxvirus pour la vaccination en espèce aviaire

La famille des poxvirus représente un groupe intéressant dans le développement de vecteurs vaccinaux contre de multiples maladies, en partie grâce à sa capacité à combiner sécurité et immunogénicité. La taille de son génome et son potentiel pour les recombinaisons homologue autorise l'insertion de près de 25 kb d'ADN étranger, permettant l'expression de gène induisant une forte immunité contre les Ag cibles. (Moss 1996)

Depuis quelques années déjà des vaccins pox recombinants utilisant HA comme antigène sont disponibles en élevage aviaire. C'est notamment le cas du vaccin recombinant Fowlpox-H5, Trovac® commercialisé aux USA par MERIAL® (Paoletti 1995). Les avantages de ce vaccin vanté par le laboratoire sont :

1. Possibilité d'immunisation en une seule injection à J1
2. Possibilité de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés
3. Pas de problème de résidu associé à l'adjuvant

Ce vaccin est entièrement répliquatif chez le poulet et confère une protection efficace avec réduction de l'excrétion virale. Par ailleurs bien qu'utilisant HA comme antigène, il a été démontré que l'immunité mise en place était à médiation cellulaire, contrairement à ce qui est observé avec les vaccins inactivés (Hghihghi 2010).

Les *Avipoxvirus* semblent également suffisamment immunogéniques dans les espèces chez lesquelles ils ne sont pas entièrement répliquatifs car ils peuvent entrer dans la cellule et exprimer des gènes précoces sans qu'il y ait une production complète de virions. Cependant, il apparaît que l'efficacité de ces vaccins non répliquatifs est fortement dose-dépendante (dose à utiliser souvent supérieure à celles des vaccins répliquatifs). Ainsi, dans une étude testant le vaccin Trovac® chez des canards, chez qui le vecteur n'est pas répliquatif, les résultats obtenus se sont révélés moins bons que ceux d'un vaccin inactivé H5N9 classique, en particulier concernant la protection clinique et l'excrétion virale, traduisant la nécessité d'augmenter les doses vaccinales dans le protocole d'immunisation (Steensels 2009).

Ainsi l'utilisation de vecteurs répliquatifs semble plus intéressante en termes de dose vaccinale, cependant le principal problème lié à l'utilisation de vecteur homologue est la présence possible d'une immunité pré vaccinale dirigée contre le vecteur, laquelle limite l'efficacité du vaccin. En effet, bien que l'utilisation du Trovac® ne soit pas contre-indiquée en présence d'anticorps maternels anti-influenza ou anti fowlpox (immunité passive), son efficacité diminue considérablement chez les animaux précédemment vaccinés ou infectés par

le fowlpox (immunité active) (Bublôt 2006). Cet inconvénient majeur justifie les recherches actuelles sur l'utilisation de vecteurs non homologues, c'est-à-dire dont l'espèce cible n'est pas l'espèce à laquelle le vaccin est destiné

Ainsi, les *Poxvirus* ont déjà fait leur preuve comme vecteur pour la mise au point de vaccins influenza aviaires. Cependant, l'utilisation d'une HA comme antigène pose le problème de la durabilité du vaccin face aux mutations permanentes des souches sauvages. En conséquence, il paraît intéressant de choisir un vecteur pox non homologue et d'y associer une protéine hautement conservée telles que M2.

CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Vaccins et souris utilisées

Deux vaccins recombinants intragéniques utilisant la souche sauvage myxomateuse T1 comme vecteur sont testés dans cette étude. Contrairement à la technique intergénique, aucun gène n'est supprimé. Le gène M2e influenza A aviaire à intégrer est collé au gène des protéines d'enveloppe M022 ou M071, ce qui permet de contrôler le lieu d'expression de M2e. De ce fait, la protéine M2e est accolée à la partie N terminale des protéines M022 ou M071, au sein de la membrane, site privilégié pour stimuler le SI.

On obtient ainsi les deux vaccins suivant :

- 1 - Virus myxomateux recombinant M022L-M2e semi-purifié
- 2 - Virus myxomateux recombinant M071L-M2e semi-purifié

Quatre lots de souris de type Balb/c, comprenant chacun trois individus, sont constitués :

- 1 - le premier lot correspond à des souris naïves non immunisées
- 2 - le second à des souris ayant survécu à une épreuve virulente avec la souche sauvage de virus influenza PR8
- 3 - le troisième à des souris recevant 3 injections sous cutanée, à une semaine d'intervalle, de 100 µl de M022-M2e (pfu = 10^6)
- 4 - le quatrième, à des souris recevant 3 injections sous cutanée, à une semaine d'intervalle, de 100 µl de M071-M2e (pfu = 10^6)

1.2. Préparation des splénocytes

1.2.1. Prélèvement des rates

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de 0,05 ml de Rompun® (xylazine) et 0,05 ml d'Imalgène 500® (kétamine) par voie intramusculaire (cuisse gauche).

Après incision de la cavité abdominale, la rate est prélevée et déposée dans un tube Falcon® de 15 ml contenant 5 ml de milieu complet (ce milieu complet étant constitué de DMEM complété par 2 mmol de glutamine, 25 mmol d'hépes, 0,1 mmol de β -mercaptoéthanol, 1 mmol de pyruvate de sodium, du sérum de veau fœtal 10%, 100 μ g/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine).

1.2.2. Purification des splénocytes

Les rates sont dilacérées à l'aide d'un piston de seringue de 5 ml puis le contenu de chaque puits est versé dans un tube identifié de 15 ml et centrifugé à 20°C durant 5 minutes à la vitesse de 300 g.

Le surnageant est éliminé et 1 ml de tampon ACK est ajouté au culot, remis en suspension (tampon ACK : acide chlorhydrique tamponné à 7,2-7,4 complété par du chlorure d'ammonium à 155 mmol/L, de l'hydrogencarbonate de potassium à 10 mmol/L et de l'EDTA à 0,1 mmol/L).

Les tubes sont incubés à température ambiante durant cinq minutes au bout desquels la réaction est arrêtée en ajoutant 5 ml de milieu complet. Les tubes sont centrifugés avec les mêmes paramètres que précédemment. Les culots sont lavés deux fois avec 5 ml de milieu complet puis les cellules sont filtrées sur un filtre nylon de 40 μ m (falcon).

Pour chaque échantillon, 20 μ l de la solution filtrée sont ajoutés à 1 ml de PBS. Après ajout de 9 ml de solution tampon, les cellules sont comptées avec un compteur de cellules (Beckman Coulter Z₂). Les échantillons filtrés sont ensuite dilués en milieu complet à la concentration de $8 \cdot 10^6$ cellules par ml.

1.2.3. Mise en culture des cellules

1.2.3.1. Stimulation pour le marquage intracellulaire

Les solutions de cellules purifiées à 8.10^6 sont en partie prélevées (6 ml pour les trois échantillons témoins négatifs, 5 ml pour les neuf autres) et de la bréfeldine (fournie dans le kit cytoperm/cytofixe Becton Dickinson) y est ajoutée à la concentration finale de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Chaque solution est ensuite répartie dans 6 ou 5 puits à fond plat de plaque 24 puits de façon à avoir 1 ml par puits, chaque puits d'un même échantillon subissant une stimulation différente. Ainsi on ajoute selon le puits 1 ml :

- de milieu complet
- de PMA-Iono (uniquement pour les trois souris témoins négatifs, PMA : 50ng/ml, Iono 500 ng/ml)
- de peptide M2 (10 $\mu\text{g/ml}$ final)
- d'une solution de PR8 inactivé (MOI final=2)
- d'une solution de virus vecteur T1 (MOI final=1)
- d'une solution de virus vaccinal (MOI final =1).

(Concernant la solution de virus vaccinale, nous utilisons un mélange équivalent de M022 et de M071 pour les témoins positifs et négatifs, tandis que les échantillons vaccinés sont stimulés avec le même vaccin que celui ayant servi pour l'immunisation.)

Les plaques sont mises à l'étuve à 37°C pendant six heures puis, au terme de cette incubation les cellules sont centrifugées à 20°C, durant 5 minutes à la vitesse de 300 g. Les surnageants sont ensuite éliminés et les culots sont remis en suspension dans 800 μl de tampon FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Les tubes sont une nouvelle fois centrifugés comme précédemment puis conservés à 4°C.

1.2.3.2. Stimulation pour les ELISA

Dans des plaques 48 puits à fond conique, on verse 500 μl par puits de cellules purifiées à 8.10^6 cellules/ml. Comme précédemment, chaque témoin négatif est déposé dans 6 puits distincts tandis que les échantillons des témoins positifs et des deux lots vaccinés sont distribués dans 5 puits chacun.

La stimulation des cellules se fait selon le même principe que précédemment en versant 500 µl de réactif par puits :

- de milieu complet
- de PMA-Iono (uniquement pour les trois souris témoins négatifs, PMA : 50ng/ml, Iono 500 ng/ml)
- de peptide M2 (10 µg/ml final)
- d'une solution de PR8 inactivé (MOI final=2)
- d'une solution de virus vecteur T1 (MOI final=1)
- d'une solution de virus vaccinal (MOI final =1).

Les plaques sont ensuite placées à l'étuve à 37°C. Au bout de 24 heures, 500 µl de surnageant sont récupérés dans chaque puits. Ces prélèvements sont stockés à -20°C en attendant leur analyse.

Les plaques de stimulation sont remises à l'étuve pour 48 heures. Ainsi, 72 heures après le début de la stimulation les 500 µl restant de surnageant sont récupérés et stockés à -20°C en attendant leur analyse.

1.2.3.3. Marquage et stimulation pour le CFSE

La lampe de la hotte étant éteinte, pour chaque échantillon, 700 µl de solution purifiée à 8.10^6 cellules/ml sont versés dans un tube auxquels on ajoute 111 µl d'une solution de PBS contenant 1% de CFSE. Au bout de 5 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant 5 ml de milieu complet. Les cellules sont centrifugées à 20°C durant 5 minutes à 300 g et le surnageant est éliminé. Un second lavage est réalisé de la même façon avec 5 ml de milieu complet et, après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspensions dans 600 µl de milieu complet.

Dans des plaques 96 puits à fond conique, chaque tube est réparti dans six puits à raison de 100 µl par puits. Chaque échantillon est ainsi stimulé de six façons différentes en ajoutant 100 µl par puits du réactif correspondant, à savoir :

- un puits non stimulé complété par du milieu complet
- un puits stimulé avec du Con A (1 µg/ml)
- un puits stimulé avec le peptide M2 (10 µg/ml)
- un puits stimulé avec la souche sauvage de virus influenza PR8 (MOI=2)

- un puits stimulé avec le virus T1 (MOI=1)
- un puits stimulé avec le vaccin (MOI=1)

(Comme précédemment, nous utilisons un mélange équivalent de M022 et de M071 pour les témoins positifs et négatifs tandis que les échantillons vaccinés sont restimulé avec le même vaccin que celui ayant servi pour l'immunisation)

Les plaques sont ensuite placées durant dans l'étuve à 37°C.

Après cinq jours d'incubation, les cellules sont transférées en microtube et analysées directement au Facscalibur. La viabilité cellulaire est mesurée par ajout d'iodure de propidium juste avant l'acquisition Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel Flow Jo.

1.2.4. Marquage intracellulaire

Les cellules stimulées sont réparties entre quatre puits d'une plaque 96 puits à fond conique, à raison de 150 µl par puits. Pour chaque échantillon distribué, cinq marquages intracellulaires différents sont testés :

- CD90.2-FITC (Thy2.1 BD)/CD4-PerCP (RM4-5, BD) et IgG-APC (A110-1, BD)
- CD90.2-FITC /CD4 et IL-2-APC (JES6-5H4)
- CD90.2-FITC /CD8 PerCP (53-6.7 BD) et IFN γ APC(XMG1.2 BD)
- CD90.2-FITC /CD8 PerCP (53-6.7 BD) et TNF α APC(MP6-XT22 BD)
- CD90.2-FITC /CD8 et GzB Alexa 647 (16G6, eBioscience)

Les plaques sont centrifugées cinq minutes à 900 g puis, le surnageant est éliminé et les culots sont remis en suspension dans 50 µl de solution de blocage (Mouse FCR Block Becton) dilué au 50^{ème} dans du tampon FACS. Les plaques sont laissées quinze minutes à 4°C puis 50 µl par puits d'AC de surface dilués au 50^{ème} dans du tampon FACS sont ajoutés (CD3/CD4 ou CD3/CD8 selon le puits).

Les plaques sont laissées une nouvelle fois à 4°C, pendant 20 minutes, puis elles sont centrifugées à 20°C durant deux minutes à 1000 g. Le surnageant est jeté et les cellules sont remises en suspension dans 150 µl de tampon FACS. Une seconde centrifugation est réalisée et après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 100 µl de tampon Cytoperm/cytofix (Becton).

Les plaques sont laissées vingt minutes à 4°C puis centrifugées à 4°C durant trois minutes à 1000 g. Les culots sont remis en suspension dans 150 µl de tampon perm/wash (Becton)

dilués au 10^{ème} dans du tampon FACS. Deux lavages sont réalisés et les cellules sont remises en suspension dans 50 µl de la solution d'AC intracellulaires (IgG, IL-2, IFN γ , TNF α ou GzB) diluée au 100^{ème} dans du tampon perm/wash.

Les plaques sont laissées trente minutes à 4°C puis lavées 4 fois comme décrit précédemment. Les 2 premiers lavages se font avec 150 µl par puits de tampon perm/wash dilué au 10^{ème} dans du tampon FACS et ensuite les deux suivant avec 150 µl/puits de tampon FACS.

Les cellules sont reprises dans 150 µl de tampon FACS et directement analysées avec le cytomètre en flux (Facsalibur Becton Dickinson). 20000 lymphocytes sont enregistrés.

Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel Flow Jo.

1.2.5. Tests ELISA

1.2.5.1. Test ELISA IL2

Nous avons utilisé le kit ELISA « Duoset® mouse IL-2 » de R&D Systems® contenant :

- des anticorps de capture à la concentration initiale de 180 µg/ml.
- des anticorps de détection à la concentration initiale de 72 µg/ml.
- une solution standard d'IL2 à la concentration initiale de 100 ng/ml.
- 1 ml de Streptavidin-HPR.

Les plaques ELISA 96 puits sont chargées avec 100 µl par puits d'AC de capture dilués dans du PBS à la concentration de travail de 1 µg/ml puis placées à l'étuve à 37°C pendant une nuit. Elles sont lavées trois fois avec du PBS Tween 0,05% et rincées une fois avec du PBS. Pour le blocage, 300 µl par puits de solution bloquante (PBS 1% BSA) sont ajoutés pendant une heure à température ambiante. Les plaques sont à nouveau lavées. Pour chaque plaque, une gamme standard est réalisée avec 100 µl par puits de solution standard diluée à la concentration souhaitée dans du Reagent Diluent, avec une concentration maximale de 2000 pg/ml et en diluant au demi sur six autres duplicatas. Les échantillons sont répartis en duplicatas à raison de 100 µl par puits. Les plaques sont ensuite incubées deux heures à 37°C.

Les plaques sont une nouvelle fois lavées, puis 100 µl par puits d'AC de détection (à la concentration de travail de 400 ng/ml) sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées une heure à 37°C.

Après 3 lavages, 100 µl par puits de Streptavidin-HRP (dilué dans du Reagent Diluent au 1/200) sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées vingt minutes à 37°C à l'abri de la lumière.

Après 3 lavages, 100 µl par puits de TMB (TMB 20X dilué au 1/20 dans du tampon citraté) sont ajoutés pour la révélation. Les plaques sont placées vingt minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière puis la réaction est stoppée en versant 100 µl par puits de solution stop (sulfate d'ammonium). Les plaques sont directement lues avec le VersaMax (molecular devices) en se réglant à la longueur d'onde de 450 nm.

Certains puits ayant saturé, les échantillons concernés ont été re-testés en suivant le même protocole que celui décrit ci-dessus, mais en les diluant dans du PBS au 1/2, 1/4 et 1/8.

1.2.5.2. Test ELISA Interféron gamma

Nous avons utilisé le kit ELISA « Duoset® mouse IFN γ » de R&D Systems® contenant :

- des anticorps de capture à la concentration initiale de 720 µg/ml.
- des anticorps de détection à la concentration initiale de 144 µg/ml.
- une solution standard d'IFN γ à la concentration initiale de 60 ng/ml.
- 1 ml de Streptavidin-HRP.

Les plaques ELISA 96 puits sont chargées avec 100 µl par puits d'AC de capture redilués dans du PBS à la concentration de travail de 4 µg/ml puis placées à l'étuve à 37°C pendant une heure.

Elles sont lavées trois fois avec du PBS Tween 0,1% et rincées une fois avec du PBS.

Pour le blocage, 300 µl par puits de solution bloquante (PBS 5% BSA) sont ajoutés et les plaques sont laissées pendant une heure à température ambiante.

Les plaques ont à nouveau été lavées. Pour chaque plaque, une gamme standard est réalisée avec 100 µl par puits de solution standard diluée à la concentration souhaitée dans du Reagent Diluent avec une concentration maximale de 2000 pg/ml et en diluant au demi sur six autres duplicatas. Les échantillons sont répartis en duplicatas à raison de 100 µl par puits. Les plaques ont ensuite été incubées deux heures à 37°C.

Les plaques sont une nouvelle fois lavées puis 100 µl par puits d'AC de détection (à la concentration de travail de 800 ng/ml) sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées deux heures à 37°C.

Après 3 lavages, 100 µl par puits de Streptavidin-HRP (dilués dans du Reagent Diluent au 1/200) sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées vingt minutes à 37°C à l'abri de la lumière.

Après 3 lavages, 100 µl par puits de TMB (TMB 20X dilué au 1/20 dans du tampon citraté) sont ajoutés pour la révélation. Les plaques sont placées vingt minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis la réaction est stoppée en versant 100 µl par puits de solution stop (sulfate d'ammonium).

Les plaques sont directement lues avec le VersaMax (molecular devices) en se réglant à la longueur d'onde de 450 nm.

2. RESULTATS

2.1. Les vaccins M022 et M071 ne protègent pas contre le virus PR8

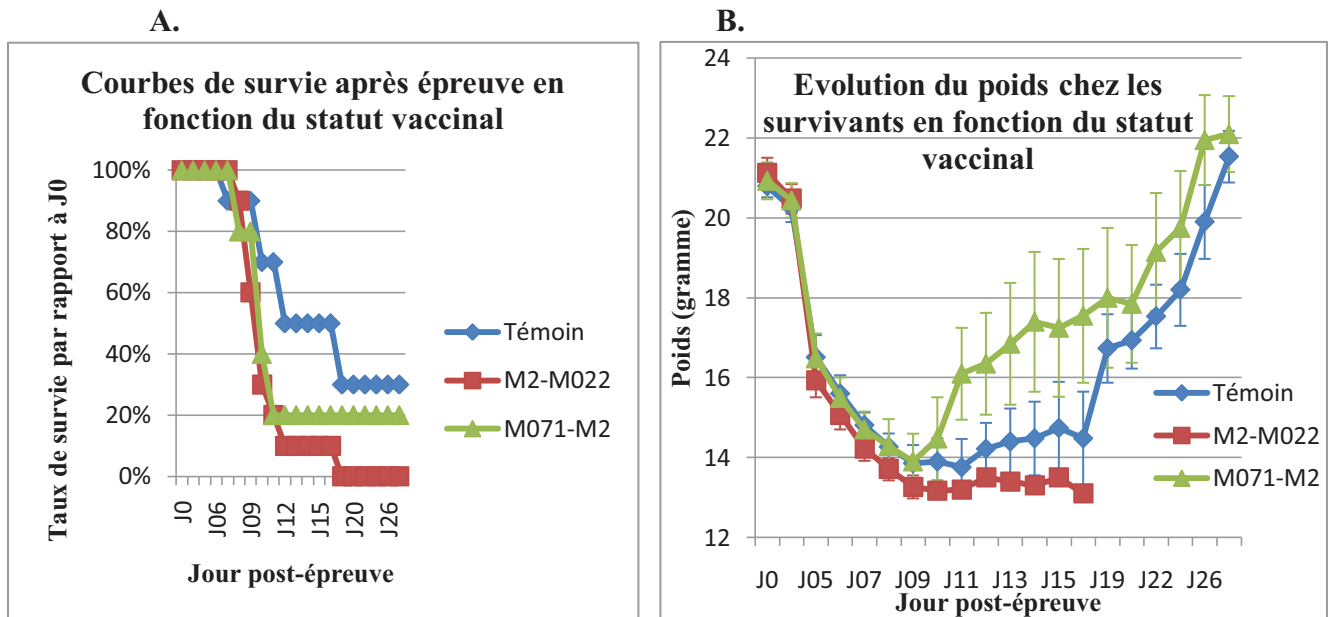
L'essai clinique est détaillé dans la thèse de M. Kevin Ortion. Pour se faire, trente souris femelles de souche Balb/cJ âgées de 5 semaines ont été réparties au hasard dans 6 cages différentes, à raison de 5 souris par cage (deux lots témoins, deux lots vaccinés M022, et deux lots vaccinés M071).

Pour les quatre lots vaccinés, le protocole de vaccination a été le suivant : 3 injections sous-cutanées de 100 µL de vaccin (soit 10^6 pfu) à 21 jours, 14 jours et 7 jours avant l'épreuve virulente. Les souris témoins n'ont reçu aucune injection.

Le virus utilisé pour l'épreuve est un virus Influenza A PR8 lot RV2 faiblement pathogène pour l'homme, mais pathogène pour la souris. Chaque souris reçoit 2000 pfu (soit 30 µL de solution) du virus Influenza par injection intra-nasale.

Un suivi journalier est assuré pendant 25 jours et plusieurs paramètres sont relevés pour évaluer la protection clinique du vaccin :

- le poids ;
- la note clinique des souris (note clinique subjective sur 8) ;
- l'aspect du pelage, noté de 0 à 4 (0 pour un pelage lisse et propre, 4 étant la note la plus sévère, pour un poil très piqué, raréfié et sale) ;
- la présence d'un jetage, noté de 0 à 2 (0 en cas d'absence de jetage, 1 en cas de présence de jetage sévère modéré, 2 en cas de présence de jetage plus conséquent avec prurit nasal plus marqué) ;
- la présence d'éternuement, noté de 0 à 2 (0 en cas d'absence, 1 en cas d'éternuement modéré, 2 en cas d'éternuement sévère).



* **Figure N°12 : Evaluation de la protection clinique conférée par M022 et M071**

A. Courbes de survie de Kaplan-Meier en fonction du statut vaccinal

B. Evolution du poids des survivants de chaque groupe après épreuve

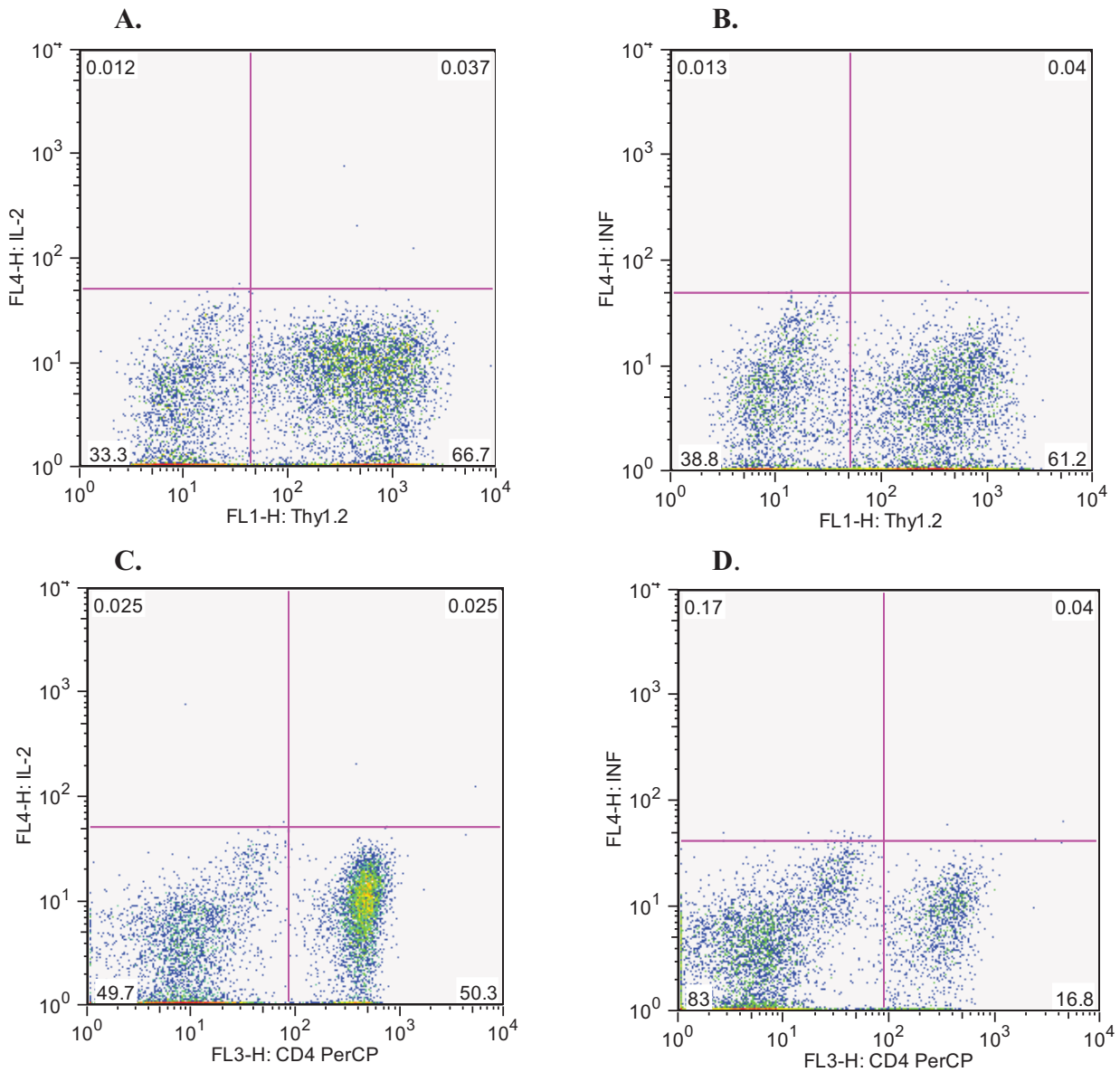
La vaccination par M2-M022L a un effet délétère significatif sur l'espérance de vie. En revanche, pour le groupe M071, bien que la comparaison avec le groupe témoin montre une espérance de vie moindre, les différences ne sont pas significatives ($\chi^2 = 1,2597$; $df = 1$; $p = 0,2617$). (cf figure n°12.A)

L'analyse montre que le vaccin M022 a un effet négatif moyen sur le poids (-2,897 grammes) par rapport au groupe témoin, alors que le vaccin M71 a un effet bénéfique sur le poids (+0,722 grammes), cependant l'ANOVA montre qu'il n'y a pas d'effet vaccin significatif ($p = 0,310$). (cf figure n°12.B)

Les premiers signes cliniques – jetage, éternuement, poil piqué – apparaissent après le deuxième jour qui suit l'inoculation du virus influenza. À partir du dixième jour d'observation et jusqu'à la fin de l'expérience, le groupe témoin est celui qui a la note clinique moyenne la plus faible, alors que le groupe M2-MO22L a la note clinique moyenne la plus élevée. L'ANOVA montre que, si les 2 vaccins ont un effet négatif sur la note clinique par rapport au groupe témoin (effet deux fois plus important pour le vaccin M2-M022L), cet effet de la vaccination n'est pas significatif ($p = 0,168$).

Il nous a paru important de comprendre pourquoi les vaccins recombinants n'induisaient pas une réponse protectrice. Nous avons donc caractérisé la réponse immunitaire anti-M2 induite suite à une immunisation par nos vaccins recombinants.

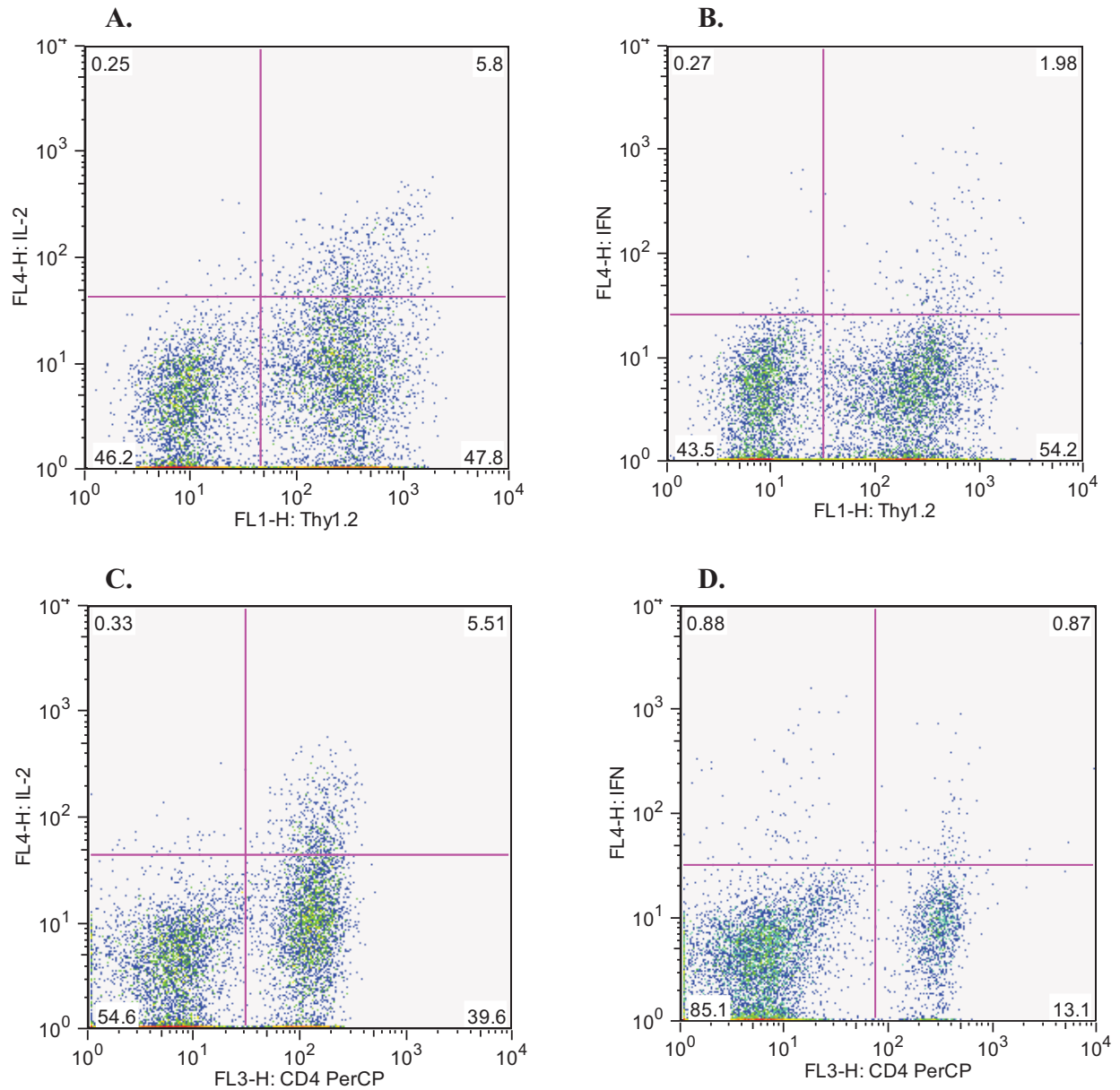
2.2. Les vaccins recombinants n'induisent pas la présence de lymphocytes T spécifique du M2



* **Figure N°13.1 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris témoins négatifs non stimulées.**

(A. marquage CD3/IL-2, B. marquage CD3/IFN, C. marquage CD4/IL-2, D. marquage CD4/IFN)

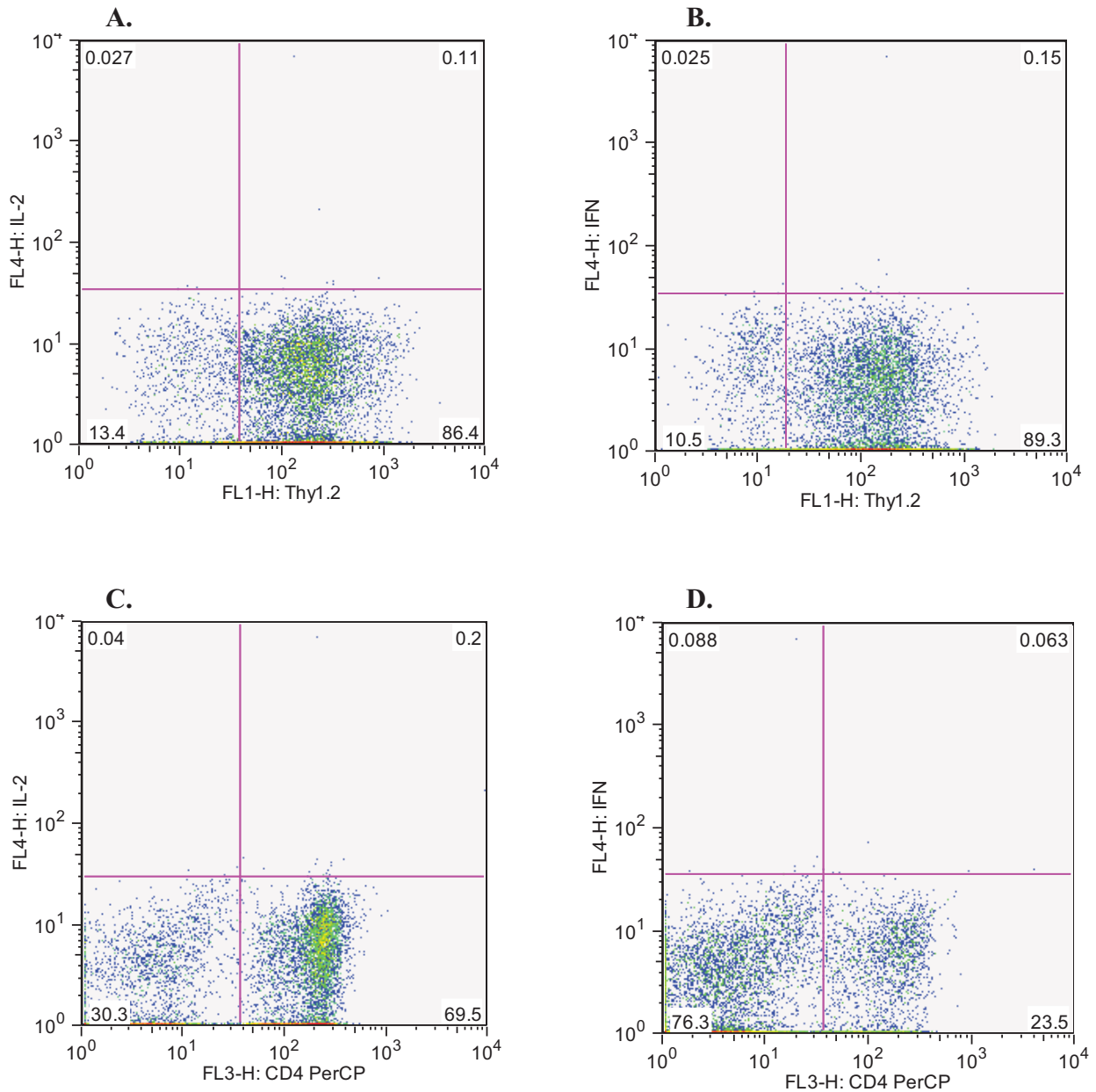
Après marquage intracellulaire, les splénocytes purifiés des souris naïves non stimulées sont analysés en cytométrie en flux comme indiqué précédemment. Les cadres supérieurs droits correspondent aux cellules CD3⁺ ou CD4⁺ activées produisant de l'IL-2 ou de l'IFN selon le graphique.



* **Figure N°13.2 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris témoins négatifs stimulées P.I.**

(A. marquage CD3/IL-2, B. marquage CD3/IFN, C. marquage CD4/IL-2, D. marquage CD4/IFN)

Les splénocytes purifiés des souris naïves sont stimulés pendant six heures avec de la PMA-ionomycine. Après marquage intracellulaire, ils sont analysés en cytométrie en flux comme indiqué précédemment.



✱ **Figure N°13.3 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris témoins positifs immunisées PR8 et restimulées PR8.**

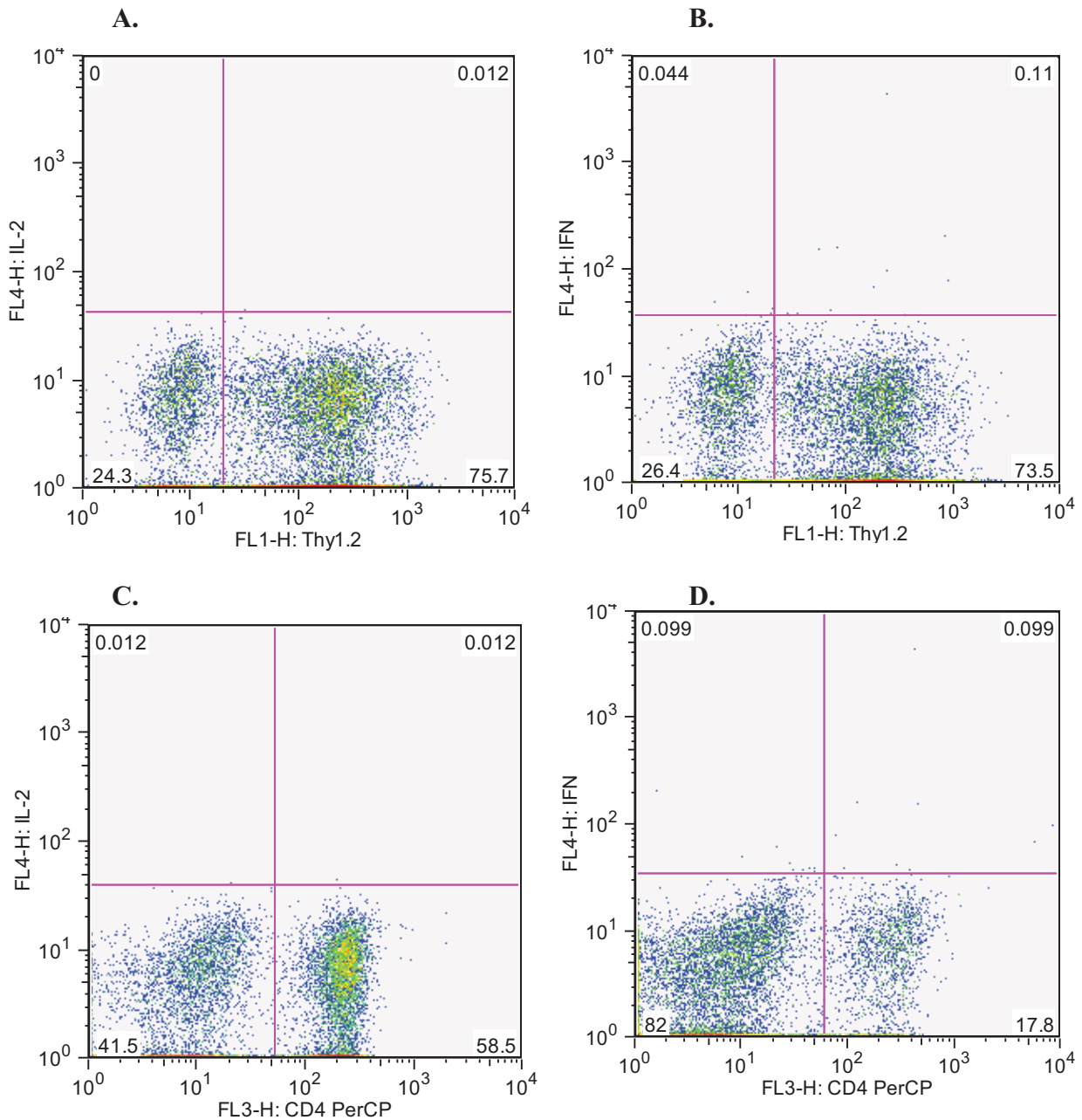
(A. marquage CD3/IL-2, B. marquage CD3/IFN, C. marquage CD4/IL-2, D. marquage CD4/IFN)

Les splénocytes purifiés des souris ayant survécu à l'inoculation de virus PR8 sont stimulés pendant six heures avec cette même souche PR8. Après marquage intracellulaire, ils sont analysés en cytométrie en flux comme indiqué précédemment.

Les splénocytes non stimulés des souris naïves ont été analysés en cytométrie en flux après marquage intracellulaire comme décrit dans le chapitre « matériel et méthodes » pour servir de témoin négatif. Comme nous pouvions l'attendre, l'analyse n'a pas montré de cellules activées (moins de 0,01%), ce qui prouve l'absence de marquage non spécifique (cf figure n°13.1).

Parallèlement, les splénocytes purifiés de ces mêmes souris naïves ont été stimulés pendant six heures avec de la PMA-ionomycine puis analysés comme précédemment pour servir cette fois de témoin positif. Les résultats montrent quelques cellules activées IL-2+ (5,8% de CD3+IL-2+ et 5,51% de CD4+IL-2+) mais les taux obtenus sont faibles et le marquage IFN est encore plus décevant (1,98% CD3+IFN+ et 0,87% CD4+IFN+). Cette réponse est bien en deçà de ce que l'on aurait pu attendre pour ce type de stimulation (cf figure n°13.2).

Nous avons ensuite vérifié que nous pouvions détecter des cellules spécifiques du PR8 chez les souris non vaccinées ayant survécu à l'épreuve virulente avec cette même souche. Les splénocytes ont été stimulés *in vitro* avec du PR8 inactivé aux rayons ultraviolets. Cependant, les résultats ne permettent pas de mettre en évidence des cellules spécifiques du virus (cf figure n°13.3). Le marquage obtenu, très proche de celui du témoin négatif, ne révèle aucune cellule CD3+ ou CD4+ activée productrice d'IL2 ou IFN. Les images obtenues pour le GrzB et le TNFa sont similaires et ne sont pas montrées.



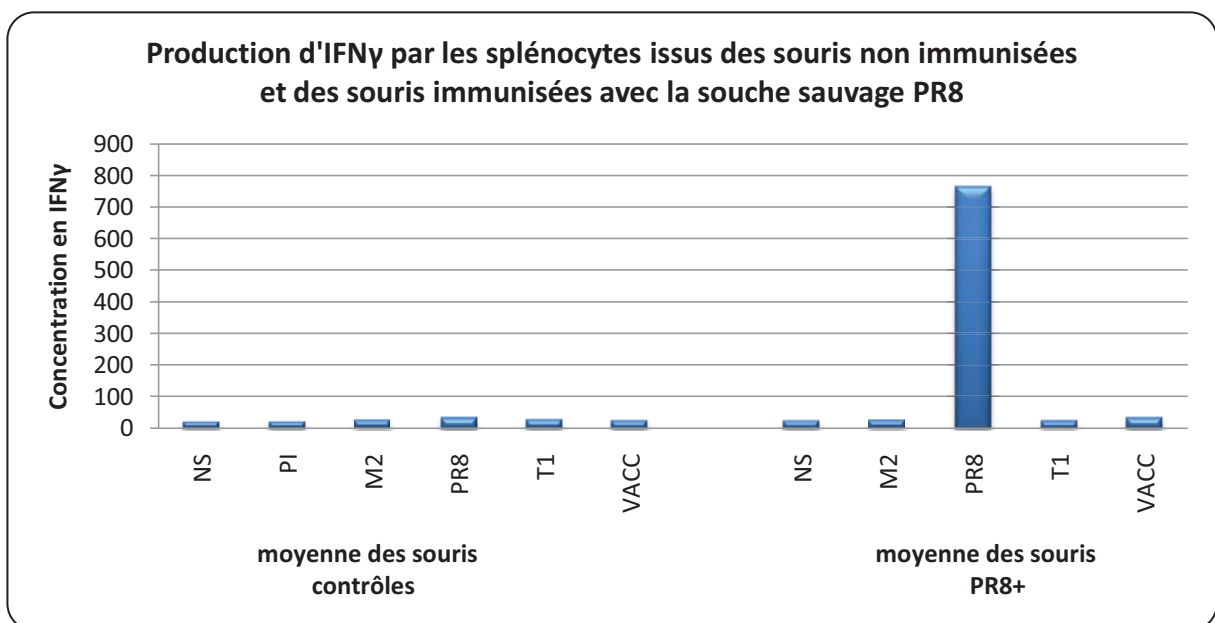
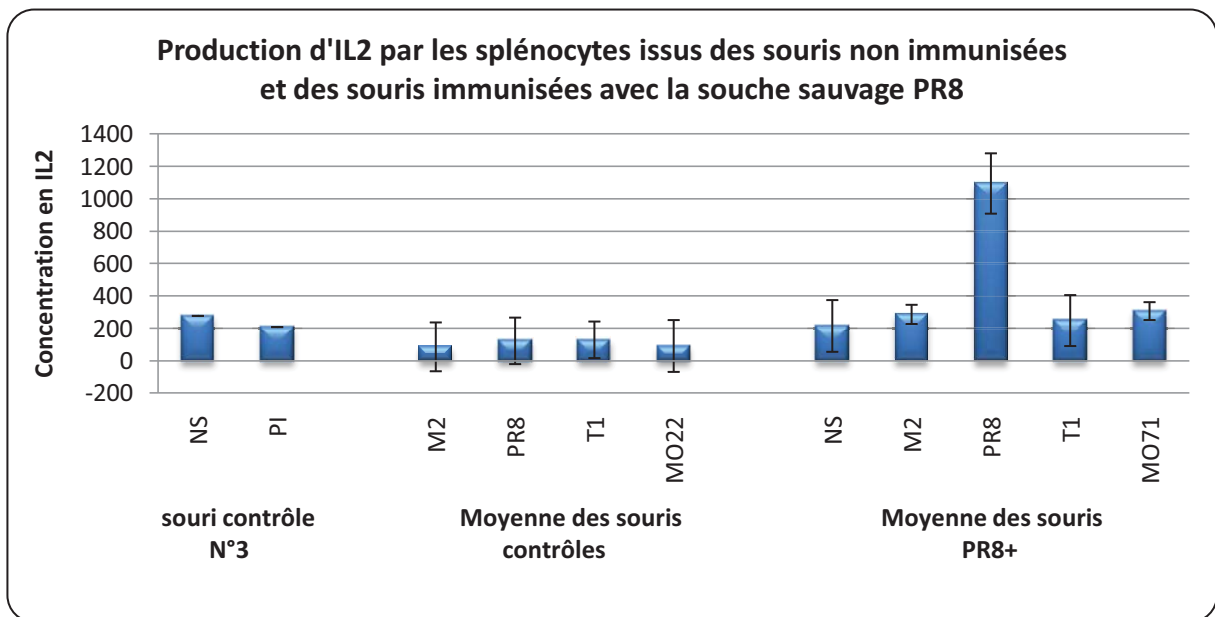
✱ **Figure N°13.4 : Marquage intracellulaire IL-2 et IFN pour les souris vaccinées M022 et restimulé M022.**

(A. marquage CD3/IL-2, B. marquage CD3/IFN, C. marquage CD4/IL-2, D. marquage CD4/IFN)

Les splénocytes purifiés des souris vaccinées avec M022 sont restimulés pendant six heures avec le vaccin M022. Après marquage intracellulaire, ils sont analysés en cytométrie en flux comme indiqué précédemment.

En ce qui concerne les échantillons vaccinés M022 ou M071, le marquage est très proche de la réponse obtenue pour le témoin négatif. Nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence de cellules spécifiques des vaccins (cf figure n°13.4)

2.3. La vaccination MO22 ou M071 n'induit pas la sécrétion significative de cytokines in vitro



* **Figure N°14.1 : Concentrations moyennes en IL-2 et en IFN obtenues par ELISA dans les lots naïfs et immunisés PR8.**

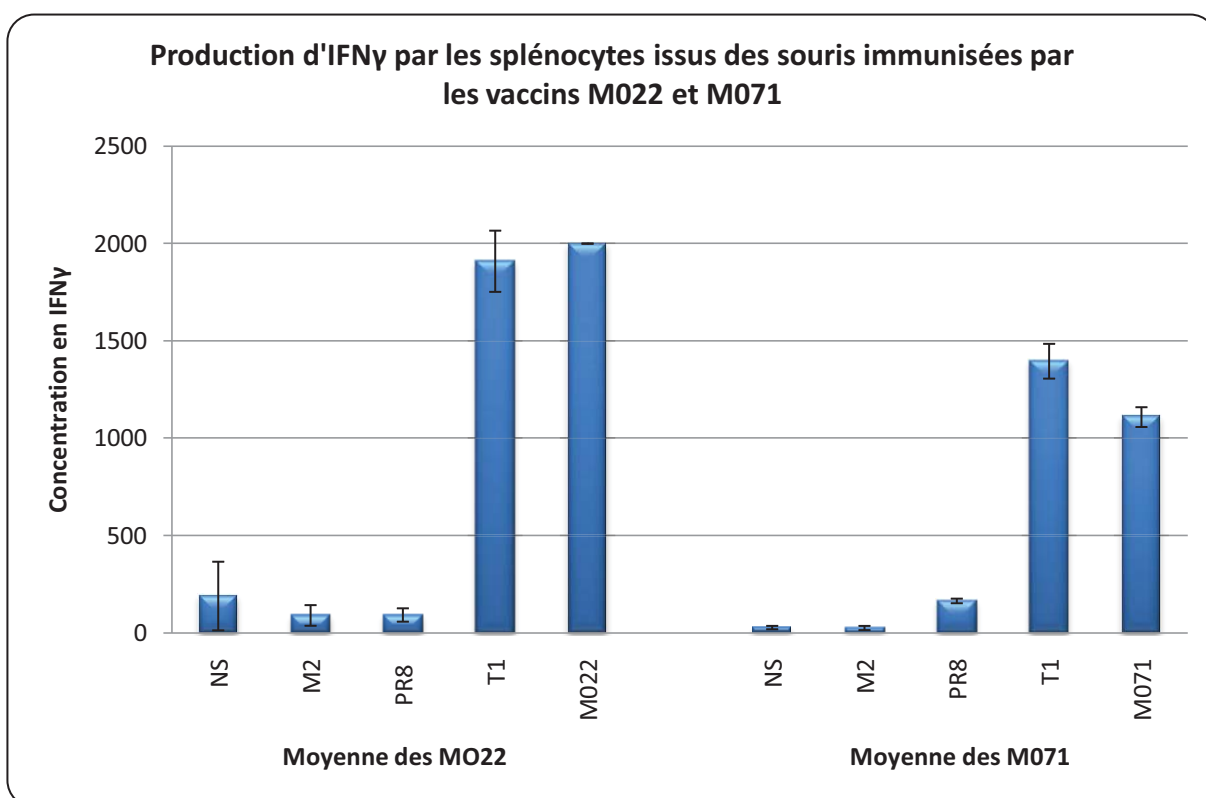
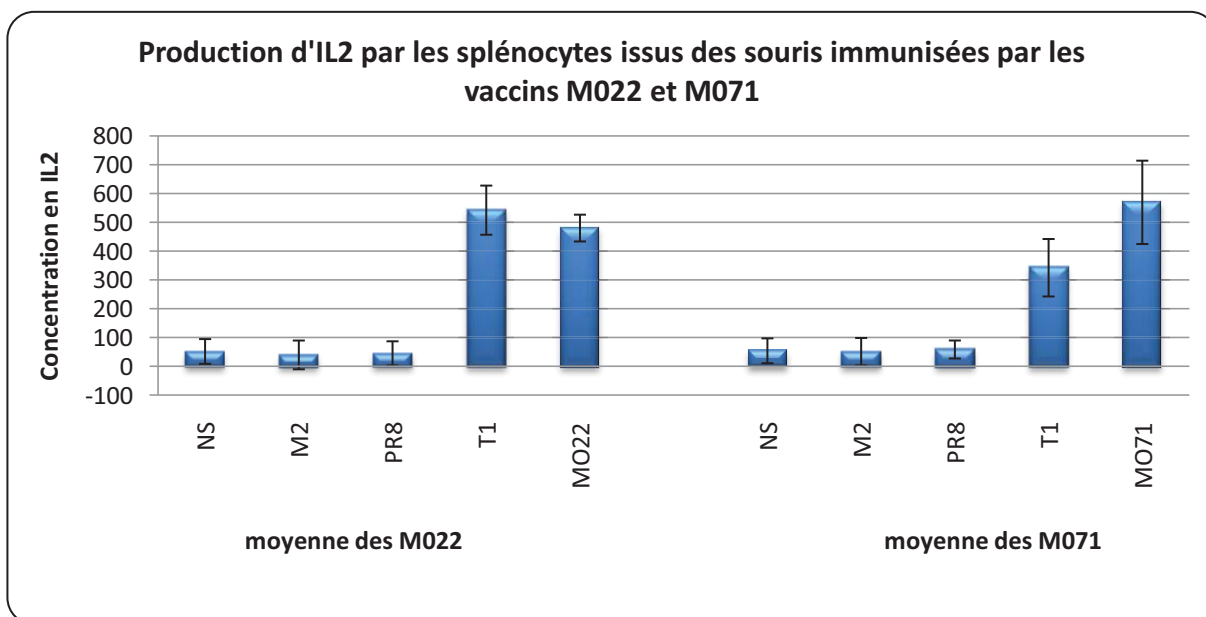
Les lots ont été constitués à partir de trois souris naïves (lot contrôle) et de trois souris ayant survécu lors d'une épreuve virulente à PR8.

Les barres verticales matérialisent les écarts-types. Pour l'IL-2, les surnageants, correspondants aux souris naïves numéros 1 et 2, non stimulés et stimulés PMA-Iono ont été utilisés au préalable et n'apparaissent donc pas dans ce graphique.

Les splénocytes des souris naïves et de celles immunisées naturellement PR8 ont été stimulés pendant 24 heures comme décrit dans le chapitre « matériel et méthode », à la suite de quoi, les surnageants ont été récupérés. La présence de cytokines dans ces surnageants a été évaluée par méthode ELISA (cf figure n°14.1).

Les splénocytes des souris saines naïves, correspondant à notre lot contrôle, n'ont pas produit de cytokines. Cela est normal pour ceux non stimulés et ceux stimulés M2, PR8, T1 ou encore M022/M071. Cependant, l'absence de réponse cellulaire lors de la stimulation PMA-Iono peut laisser penser qu'il y a eu un problème quant à la qualité des réactifs PMA et ionomycine.

Notre lot PR8+ comprenait quant à lui trois souris ayant survécu à une épreuve virulente utilisant la souche sauvage d'influenza virus PR8. Les splénocytes de ces souris ont fortement réagi à la stimulation par cette même souche, en produisant de l'IL-2 et de l'IFN γ , mais ne se sont pas activés lors de la stimulation par le peptide M2 seul ou lors de la stimulation par les virus vaccinaux M022 et M071 exprimant eux aussi M2. Cela laisse penser que l'immunité naturelle n'induit pas de cellules spécifiques de M2 en quantité suffisante pour que l'on puisse les détecter *in vitro* ou que la légère différence entre le M2 du PR8 et le M2 aviaire, utilisé pour la stimulation, fait que ce dernier n'est pas reconnu *in vitro* par le système immunitaire.



* *Figure N°14.2 : Concentrations moyennes en IL-2 et en IFN γ obtenues par test ELISA à partir des surnageants des splénocytes de nos lots de souris vaccinées. Les barres verticales matérialisent les écarts-types.*

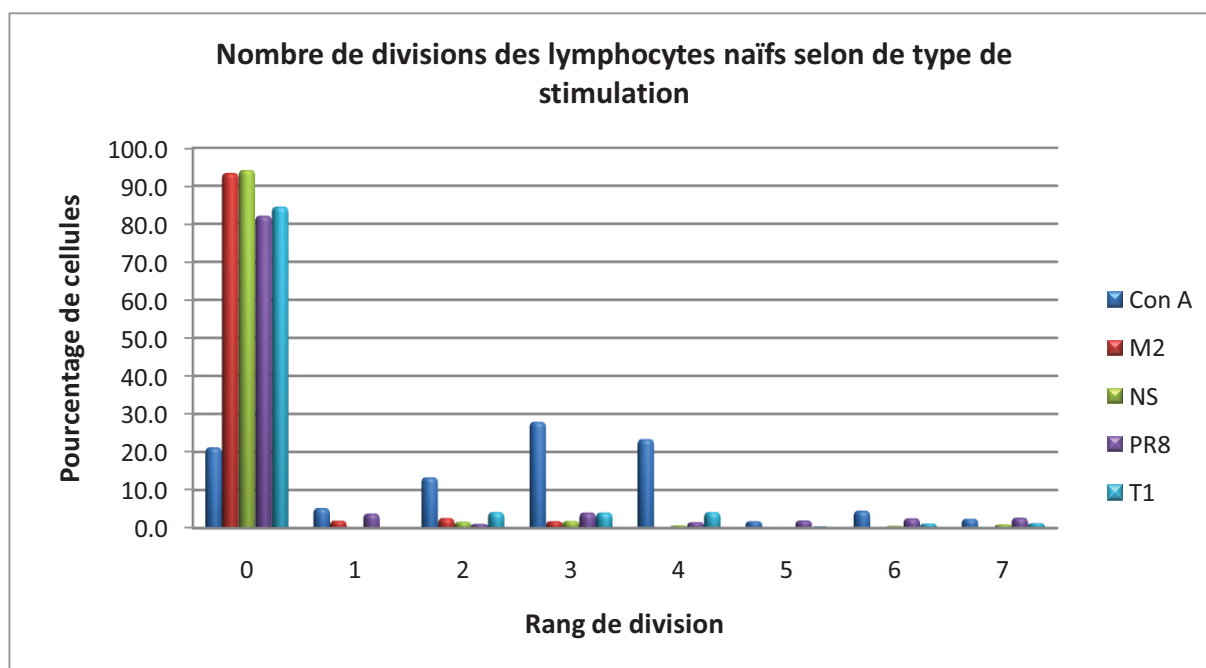
Les splénocytes des souris immunisées avec les vaccins recombinants M022 ou M071 ont été stimulés pendant 24 ou 48 heures comme décrit dans le chapitre « matériel et méthode », à la suite de quoi les surnageants ont été récupérés. La présence de cytokine dans ces surnageants a été évaluée par méthode ELISA (cf figure n°14.2).

Les résultats des tests ELISA montrent que l'immunisation par M022 ou M071 entraîne une production non négligeable de cytokines lors de la stimulation des splénocytes par le même vaccin. Cependant, cette réponse cellulaire est similaire à celle obtenue lors de la stimulation par le vecteur T1 seul.

La stimulation par la souche virale sauvage PR8 ou par le peptide M2 seul ne conduit à aucune production significative de cytokines.

Ces résultats indiquent que le vaccin induit la production de cellules spécifiques mais exclusivement dirigées contre le vecteur et non contre l'antigène M2.

2.4. La vaccination M022 ou M071 ne permet pas d'activation cellulaire orientée contre le peptide M2

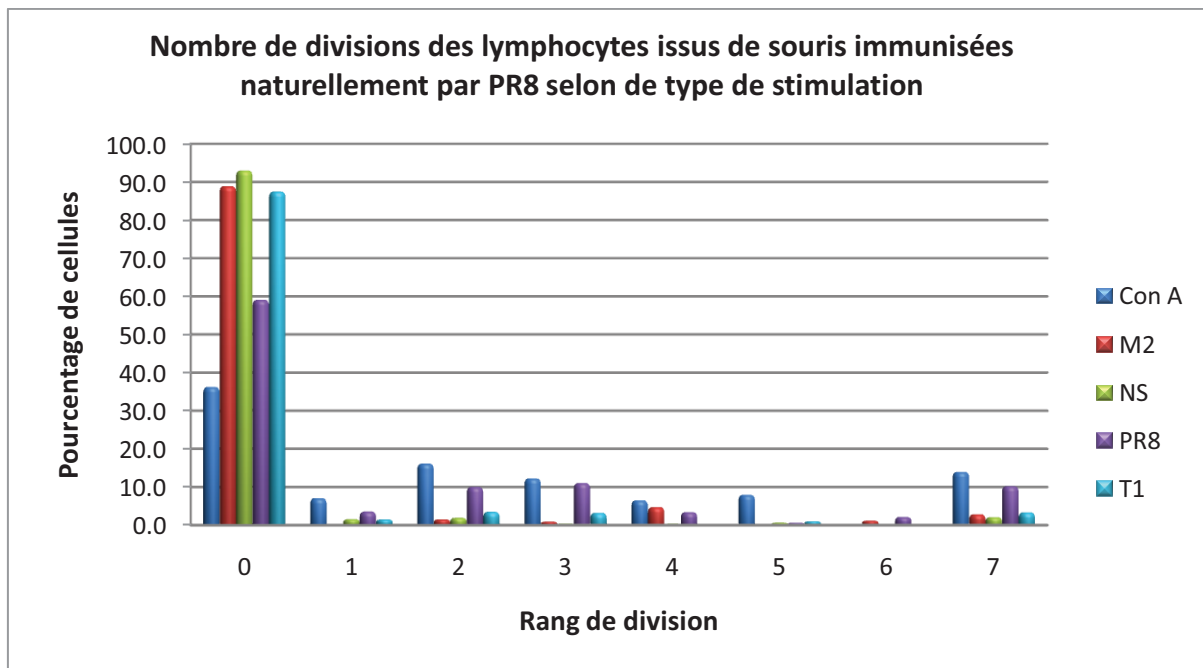


* **Figure N°15.1 : Profil de division par marquage CFSE des lymphocytes naïfs.**
Chaque groupe correspondant à une stimulation différente : Con A, le peptide M2, non stimulées, la souche virale sauvage PR8 et enfin le vecteur vaccinal T1.

Après incorporation de CFSE, les splénocytes des souris naïves sont incubés pendant cinq jours avec différents activateurs puis analysés au cytomètre en flux comme indiqué dans le chapitre « matériel et méthode ». Le marquage CFSE permet de mettre en évidence les divisions cellulaires traduisant l'activation des cellules spécifiques de l'immunité.

Dans le cas des cellules provenant de souris non immunisées, seule la stimulation par la Con A a induit une division cellulaire significative. En effet, pour ce type de stimulation, près de 80% des lymphocytes initialement présents se sont divisés ; la population cellulaire la plus importante est celle qui a réalisé trois divisions. Pour les autres types de stimulations (à savoir celle par le peptide, celle par la souche sauvage PR8 et celle par le vecteur T1), on observe que seuls 10 à 20 % des lymphocytes se sont divisés et que les profils de division obtenus sont très proches de celui des cellules non stimulées (cf figure n°15.1).

Ces résultats sont cohérents avec ce que l'on pouvait attendre : ce lot sert donc de témoin pour valider la technique et fixer les critères de négativité des résultats.



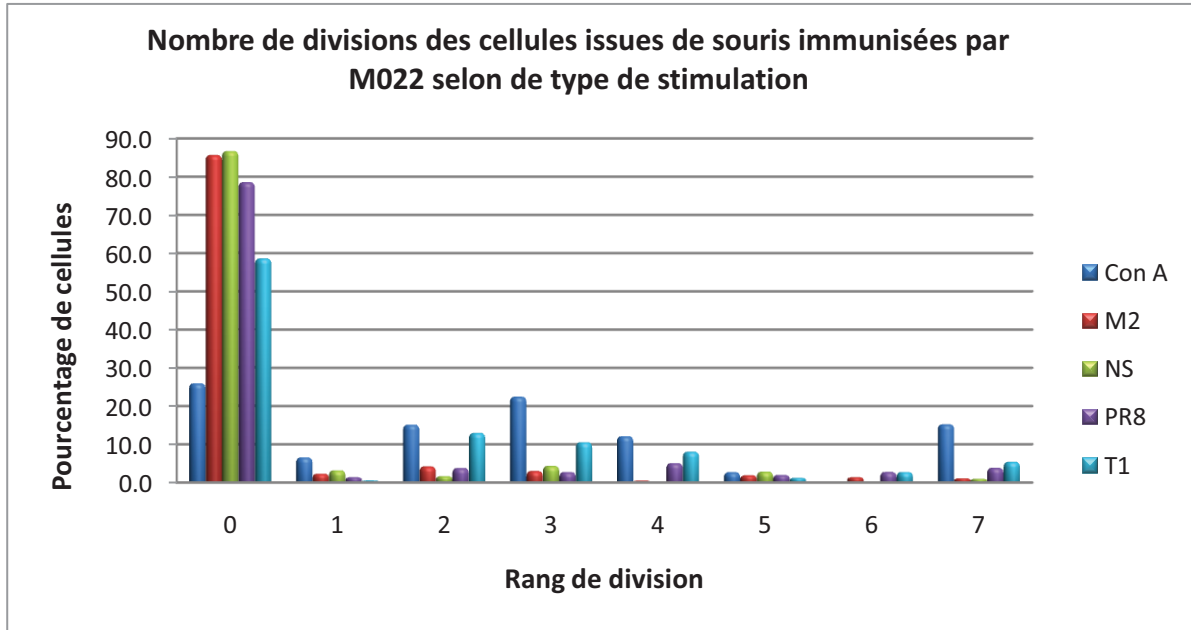
* **Figure N°15.2 : Profil de division obtenu par marquage CFSE des lymphocytes immunisés par PR8.**

Chaque groupe correspond à une stimulation différente : Con A, le peptide M2, non stimulées, la souche virale sauvage PR8, et enfin stimulées par le vecteur vaccinal T1.

Pour les souris immunisées PR8, la stimulation par la même souche sauvage que celle ayant servi pour l'immunisation induit une activation des lymphocytes se traduisant par leur division. Cette activation est un peu moins importante que pour la stimulation Con A puisqu'elle ne concerne qu'environ 40% des lymphocytes contre 65%. Elle reste néanmoins suffisante pour permettre de détecter les cellules répondantes (cf figure n°15.2).

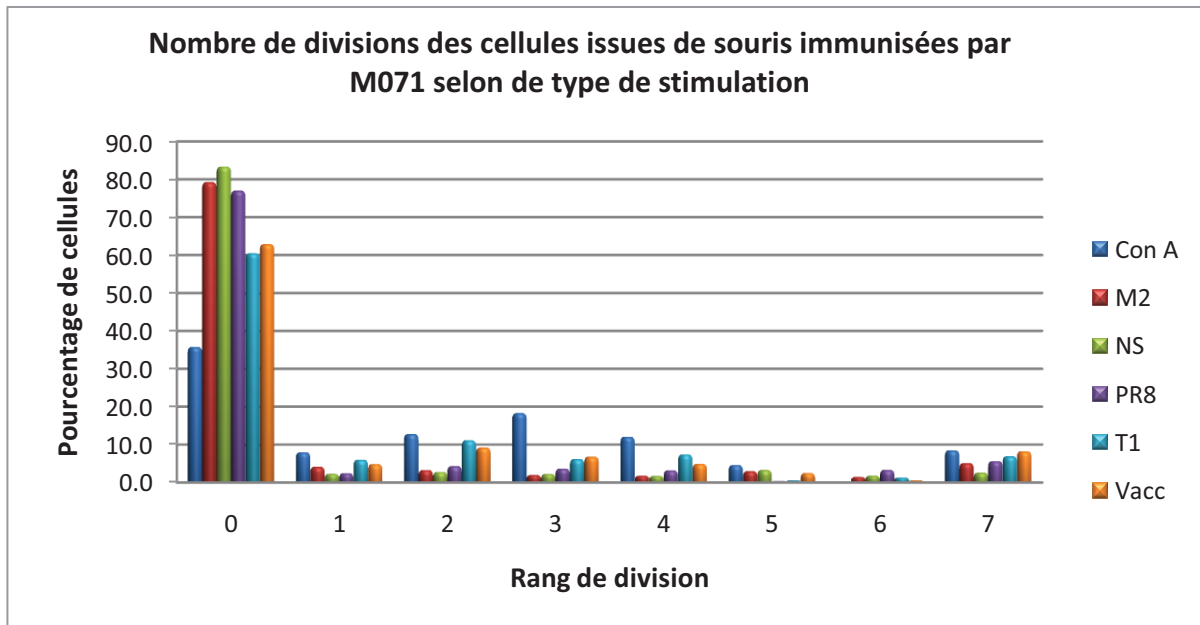
Comme on peut s'y attendre, la stimulation par le vecteur T1 n'induit pas de réponse cellulaire réelle puisque les pourcentages de lymphocytes activés avoisinent celui obtenu pour les cellules non activées et ne dépassent pas 15%.

La stimulation par le peptide M2 ne donne pas de meilleurs résultats que T1, ce qui confirme l'observation précédemment faite pour les ELISA, à savoir que l'immunité naturelle PR8 ne met pas en jeu d'immunité spécifique orientée contre le M2 aviaire détectable *in vitro*.



* *Figure N°15.3 : Profil de division obtenu par marquage CFSE des cellules immunisées avec M022.*

Chaque groupe correspond à une stimulation différente : Con A, le peptide M2, non stimulées, la souche virale sauvage PR8, et enfin le vecteur vaccinal T1.



* *Figure N°15.4 : Profil de division obtenu par marquage CFSE des cellules immunisées par M071.*

Chaque groupe correspond à une stimulation différente : Con A, le peptide M2, non stimulées, la souche virale sauvage PR8, le vecteur vaccinal T1, et enfin le virus vaccinal M071)

Pour les splénocytes des souris immunisées avec les vaccins M022 ou M071 on retrouve comme pour les lots précédents près de 65 à 75% de lymphocytes activés par la stimulation avec le Con A tandis qu'à peine 20% des cellules non stimulées se sont divisées. L'analyse conjointe de ces deux figures (cf figure n°15.3 et n°15.4) met en évidence une bonne reconnaissance du vecteur T1 par les cellules issues de souris immunisées par M022 ou M071. De plus, les cellules immunisées M071 mettent en évidence une bonne reconnaissance du virus vaccinal (pour l'immunisation M022, la stimulation par le vaccin n'a pas été testée). Cependant, il est à noter que le pourcentage de lymphocytes activés est similaire dans les deux cas (environ 40%). Si on le confronte à la faible activation des cellules par le peptide M2 (identique à celle des cellules non stimulées), tout semble indiquer que l'activation des cellules lors de la stimulation par M071 est davantage liée à la reconnaissance du vecteur T1 qu'à celle du peptide M2. Cela se confirme par le fait que pour l'immunisation par M071 comme pour celle par M022, la stimulation des cellules par la souche sauvage PR8 induit l'activation d'à peine plus de 20% des cellules, soit un résultat similaire à celui des cellules non stimulées ou stimulées par le peptide M2.

DISCUSSION

La protéine M2 est étudiée depuis déjà plusieurs années et différents vaccins l'utilisant ont déjà été expérimentés. Ainsi, en 1999, l'équipe belge dirigée par Sabine Nierynck a réussi à immuniser des souris *via* l'injection intranasale ou intrapéritonéale de protéines M2 fusionnées à une protéine d'enveloppe du virus de l'hépatite B (HBc). HBc a été ici utilisée comme un « transporteur » de l'épitope hétérologue M2, lequel se localise spontanément à sa surface. Le gène de la protéine M2HBc ayant été intégré dans le génome d'*Escherichia coli*, cette protéine a été isolée, purifiée puis associée à un adjuvant avant d'être administrée aux souris. L'épreuve virulente a mis en évidence une protection clinique de 90 à 100%. Il a été prouvé que cette protection est basée sur la sécrétion d'anticorps et qu'elle peut être transférable *via* le sérum. Ainsi, l'augmentation du caractère immunogène de la protéine M2 une fois associée à cette protéine d'enveloppe HBc, permet une protection durable contre les virus influenza de type A. (Neyrick 1999)

À l'instar de Nierynck, les premières études utilisant ce peptide, seul ou associé à un promoteur, rapportaient la présence d'AC anti-M2, laissant présager d'une immunité à orientation humorale. Cependant, les conclusions récentes mettent en évidence que ces AC ne sont pas neutralisateurs *in vitro* et que leur action *in vivo* passe par l'opsono-phagocytose des virions et des cellules infectées, ce qui empêche la formation de nouveaux virions et la propagation de l'infection (Huber 2001). L'importance des cellules NK et des LTC à également été démontrée par plusieurs études (Jegerlehner 2004, Jameson 1998)

Bien qu'efficace, la production et la purification d'un peptide (tel que M2 ou HA) est longue et onéreuse et très contraignante dans la cadre du développement d'un vaccin à grande échelle. Par exemple, concernant la grippe saisonnière, la réactualisation annuelle des souches vaccinales par le WHO et le délai de fabrication (souche définies en février pour une commercialisation du vaccin en octobre) ne permettent pas la réalisation d'un stock de vaccin couvrant plus de 7% de la population mondiale (MIV 2005). C'est pour cela que d'autres études, telles que la notre, ont cherché et cherchent encore à développer un vaccin recombinant de production moins coûteuse, exprimant la protéine M2 au sein de l'organisme de l'individu à immuniser. Cette approche est complètement différente de celle actuelle qui consiste à induire une immunité spécifique ressemblant à celle observée chez les individus

naturellement infectés, fortement corrélée à la présence d'une immunité humorale anti-HA et anti-NA (Schotsaert 2010). En effet, outre le fait d'utiliser une protéine conservée procurant une protection de large spectre, cette méthode pourrait avoir l'avantage de générer une réponse de type cellulaire.

In fine, c'est dans l'optique de valider, dans un premier temps dans le modèle murin, l'induction d'une immunité protectrice de large spectre contre les influenza virus, que les vaccins M022 et M071 ont été mis au point. L'étape suivante devrait être sur l'espèce cible du vaccin, le canard. Cependant, si l'on observe les résultats des différentes techniques mises en œuvre, il semble évident que notre objectif n'a pas été atteint.

Les résultats de M. Kevin Ortion indiquent qu'aucun des deux vaccins ne semble conférer une réelle protection clinique, tant sur la perte de poids que sur la mortalité, suite à l'infection par PR8.

Concernant notre propre observation de la réponse immunitaire cellulaire, quelle que soit la technique de validation utilisée, on retrouve la même conclusion : les souris immunisées avec nos vaccins ont développé une réponse immunitaire contre le virus vecteur T1 mais pas contre la protéine M2.

Cette absence de réponse spécifique orientée anti-M2 peut expliquer les observations cliniques citées précédemment. Nos différentes conclusions étant cohérentes : l'inefficacité de ces vaccins ne peut être mise en doute et il convient maintenant de déterminer les différentes raisons qui pourraient en être à l'origine.

Implication du virus vecteur

La capacité des poxvirus à échapper, du moins temporairement, au système immunitaire est connue depuis longtemps (McFadden 1995). On dénombre une dizaine de gènes impliqués dans ce mécanisme (cf tableau n°9) et ces protéines immunomodulatrices représentent une réelle contrainte lors de l'utilisation d'un virus myxomateux comme vecteur vaccinal. Ces facteurs incluent notamment des homologues des récepteurs IFN γ , des homologues des récepteurs TNF et des inhibiteurs des protéases sériques (Kerr 1995). Bien que le vaccin aviaire actuellement sur le marché, utilisant un avipoxvirus recombinant répliquatif chez le poulet, ne présente pas d'effets négatifs marqués, plusieurs auteurs

mentionnent qu'il est risqué d'utiliser un poxvirus chez une espèce permissive (Redfield 1987).

Gene name	Copy No.	Proposed gene product function and/or properties	Required for infection <i>in vivo</i>
M-T1	2	C-C chemokine binding protein; inhibits chemokine chemoattractant properties <i>in vitro</i>	No
M-T2	2	Soluble TNF- α receptor; binds rabbit TNF- α	No
M-T7	2	Soluble IFN- γ receptor; also binds C-C and C-X-C chemokines <i>in vitro</i>	No
MGF	1	Member of EGF family; epithelial cell mitogen	No
M-T4	2	ER-resident anti-apoptotic protein; also appears to retard class I MHC egress from ER	No, but required for replication in T lymphocytes <i>in vivo</i>
M-T5	2	Ankyrin repeat-containing protein; required for progression to late gene expression in RL-5 cells in culture	No, but required for replication <i>in vivo</i>
M11L	1	Mitochondria-resident protein; prevents mitochondrial permeability transition and subsequent induction of apoptosis cascade	No, but required for replication in monocytes <i>ex vivo</i> in absence of mitogen
SERP1	2	Serine protease inhibitor; inhibits plasmin urokinase, tissue plasminogen activator, and C1s complement protein <i>in vitro</i>	No
SERP2	1	Serine protease inhibitor; substrates unknown	No
SERP3	1	Putative serine protease inhibitor; substrates unknown	No
MV-LAP	1	ER-resident protein with zinc finger motif; promotes loss of cell-surface class I MHC, perhaps by preventing recycling to cell surface	No

❖ **Tableau N°9 : Quelques gènes immunomodulateurs des virus myxomateux (Zuniga 2003)**

Dans notre étude, nous avons utilisé la souche myxomateuse sauvage T1 non atténuée. Or, bien que ce vecteur ne soit pas répliatif chez la souris (Okeke 2006), le fait qu'il n'achève pas son cycle viral et qu'il ne produise pas de nouveaux virions viables n'empêche pas l'infection d'un petit nombre de cellules et l'initiation de la réplication associée à la traduction d'un certain nombre de gènes (Pignolet 2007). Cela est d'autant plus vrai pour les ARNm précoces dont font partie les protéines modulant la réponse immunitaire (Roberts 2008).

Nous avons pensé que le caractère non répliatif serait suffisant pour éviter l'expression du potentiel immunomodulateur du virus myxomateux. Cependant, comme nous l'avons déjà dit, l'un des problèmes de M2 est son faible potentiel immunogène et il n'est pas exclu que le T1 soit trop immunomodulateur. Ainsi, l'utilisation d'un vecteur atténué pourrait améliorer l'efficacité de notre vaccin.

Vérification de la structure 3D des protéines M022 et M071

Nos deux vaccins sont des vaccins recombinants intragéniques. Cela signifie que, contrairement aux vaccins intergéniques où un gène inutile est supprimé et remplacé par notre

gène, aucun gène n'a ici été supprimé et celui codant pour le segment extracellulaire de la protéine M2 a été accolé à l'extrémité d'un autre gène de notre choix, un gène codant pour une protéine d'enveloppe (M022 ou M071 selon le vaccin). Dans le cas des vaccins intergéniques, on ne sait pas comment la protéine que l'on cherche à synthétiser sera exprimée. Elle peut aussi bien se retrouver sur la membrane que dans le cytoplasme où elle sera donc peu au contact des agents du système immunitaire. En contrôlant le site d'expression de la protéine M2, on s'assure qu'elle sera au mieux présentée à l'organisme de l'individu à immuniser. Cependant, on ne peut tout contrôler et notamment la structure tridimensionnelle des protéines M022-M2 et M071-M2. Dans la mesure où la protéine M2 est un élément de très petite taille, il est d'autant plus à craindre que le domaine extracellulaire de cette dernière ait été enchâssé au centre de la protéine d'enveloppe lors de son repliement et soit donc invisible pour le système immunitaire.

Utilisation du peptide M2 aviaire :

L'une des caractéristiques de cette protéine est d'être quasiment identique dans toutes les souches d'influenza virus A. Il est prouvé que le taux de mutation de cette protéine, même sous pression vaccinale, est très faible. Les quelques mutants observés chez des souris fortement immunodéficientes, immunisées par transfert passif d'AC anti-M2, présentaient tous une mutation sur un unique acide aminé, tandis qu'après onze passages consécutifs chez des souris immunocompétentes correctement immunisées, aucun virus mutant n'a pu être isolé. (Gerhard 2006)

Ainsi, à l'échelle d'une population, la stabilité de M2 est un avantage. À l'échelle individuelle, la réponse immunitaire impliquant les LT CD8⁺ est fortement dépendante du CMH I (Parham 1996). Les molécules du CMH I sont des récepteurs pouvant reconnaître une multitude de ligands. Cependant, les caractéristiques du CMH I peuvent varier d'un individu à un autre et cela explique que lors de l'utilisation d'un vaccin, il y a toujours un petit pourcentage de la population vaccinée qui, de part les caractéristiques de leur CMH, ne s'immunise pas (Rammensee 1993). La compréhension du mécanisme de présentation des peptides par le CHM permet aujourd'hui de calculer la force d'interaction entre un peptide et les molécules d'un CMH précis.

Face à l'inefficacité de notre vaccin, l'une des hypothèses à envisager est que la protéine M2 aviaire que nous avons utilisée n'est pas reconnue par le CMH des Balb/c. En

effet, dans une population normale, ce problème de reconnaissance est masqué par la diversité allélique des CMH des différents individus. Dans notre étude, nous avons utilisé une lignée murine congénique. Cela implique que si le CMH de cette lignée ne reconnaît pas la protéine utilisée, alors aucune des souris étudiées ne sera immunisée.

Cette hypothèse a été confirmée par une étude de la capacité de présentation de notre peptide M2 aviaire par les CMH des balb/c, cette dernière s'avérant très faible et probablement insuffisante pour induire une réponse immunitaire spécifique (<http://www.syfpeithi.de/>).

Choix de la dose vaccinale :

On a déjà mentionné que la protéine M2 est un antigène de petite taille et peu immunogène s'il est présenté seul. Son association avec une protéine de surface (M022 ou M071) du virus T1 visait à améliorer sa présentation au système immunitaire. Cependant, faut-il encore qu'il soit administré en quantité suffisante. Dans les études précédentes où la protéine était administrée purifiée, les souris recevaient entre 5 et 50 µg de protéines. (Hagenaars 2008, Slepishkin 1995, Wu 2007)

Comme on l'a déjà dit, le poxvirus utilisé n'est pas répliquatif chez la souris (Okeke 2006). Les protéines de structures n'étant synthétisées que durant la phase d'éclipse, donc dans le deuxième temps de la réplication du génome, il est peu probable que la quantité totale de M2 possiblement présentée au système immunitaire dépasse de beaucoup la quantité initialement injectée.

Cet aspect non répliquatif n'est pas un problème en soi car, même sans réplication, le vecteur peut infecter un certain nombre de cellules et stimuler le SI *via* les CPA. Il est intéressant de noter que les poxvirus sont largement utilisés pour produire des vaccins chez des espèces où ils ne sont pas répliquatifs (Cox 1992, Pignolet 2008) tel que le *Leporipoxvirus* calicivirose, utilisé chez le chat (McCabe 2002), ou l'*Avipoxvirus* grippe (Protec-flu®) utilisé chez le cheval.

On pourrait argumenter que le vaccin anti-influenza équin non répliquatif présente l'Ag influenza HA, beaucoup plus immunogène, lequel induit une réponse à médiation humorale moins dépendante de la présentation de l'Ag par les CMH. Néanmoins, il n'est pas à exclure que la non immunisation anti-M2 soit liée à une présentation insuffisante, quantitativement parlant, de cette protéine. En effet, c'est un des éléments mis en avant par Steensels lorsqu'il

adapte le vaccin Trovac® au canard chez qui il est non répliatif. Ainsi, tout comme dans son étude, une solution possible serait d'augmenter la dose vaccinale.

Choix de la voie d'immunisation

De nombreuses études portant sur l'utilisation du peptide M2 comme Ag vaccinal inactivé ont prouvé que la voie intranasale (i.n.) induisait une forte immunité et permettait une meilleure protection clinique que les autres voies à des doses similaires (Fiers 2009).

Par ailleurs, d'un point de vue pratique, l'administration i.n. est très avantageuse dans le cadre de la vaccination de masse en élevage aviaire. En effet l'administration parentérale du vaccin de façon individuelle est beaucoup plus longue et plus risquée en terme de contamination croisée des individus. (Brandtzaeg 1989)

Concrètement, une fois induits, les LT et LB spécifiques persistent dans le parenchyme pulmonaire pendant longtemps, conférant ainsi à l'individu vacciné une protection prolongée. Dans le cas des vaccinations i.n., on peut observer une bonne immunisation humorale et cellulaire, sans corrélation avec le taux en AC sérique. Cette voie entraîne une plus forte réponse IgA que l'inoculation parentérale et stimule la sécrétion d'IgG typiquement associées à la réponse cellulaire. Par ailleurs, les virus influenza pénètrent dans l'organisme *via* les voies respiratoires et restent confinés dans les parties superficielles pendant environ cinq jours avant de se propager plus en profondeur. Dans ce contexte, une forte immunité dans l'appareil respiratoire superficiel peut avoir des conséquences non négligeables sur la capacité du virus à se propager. (Mozdzanowska 2007)

Ajout d'un adjuvant

Dans un grand nombre d'études publiées, le vaccin est adjuvé. Ainsi, l'ajout d'un adjuvant à notre vaccin est une voie possible d'étude. Les adjuvants sont des substances qui, utilisées en associations avec l'Ag, induisent une réponse immunitaire plus forte que lorsque l'Ag est utilisé seul. Cependant, un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immunitaire, il doit également l'orienter en fonction de l'infection contre laquelle il est employé. Ainsi, chaque adjuvant est capable d'activer sélectivement la voie humorale ou cellulaire. Du fait de leur faible réaction locale chez les animaux, plusieurs adjuvants sont utilisables (Mutwiri 2007). En dresser une liste exhaustive serait vain, mais on peut noter que

de façon générale, hormis chez le chat, les vaccins recombinants pox sont adjuvés pour améliorer leur efficacité.

Une autre piste serait l'association de M2 à des PAMP. La reconnaissance des PAMP par les membres de la famille des TLR est essentielle pour l'activation d'une réponse immunitaire adaptée. Cela a été démontré par un vaccin influenza constitué de quatre copies du domaine extracellulaire de la protéine M2 associé au STF2 (ligand du TLR5) administré à la dose de 0,3 µg par souris. Les individus ainsi immunisés ont présenté une réponse en anticorps significativement supérieure à celle des individus immunisés avec la protéine M2 purifiée uniquement et associée à du sulfate d'aluminium (Hulleat 2002). Ainsi, l'association de la protéine M2 au ligand d'un TLR spécifique pourrait être une alternative à l'utilisation d'adjuvant, permettant d'améliorer l'efficacité de notre vaccin.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les influenza virus représentent aujourd'hui un coût économique et humain non négligeable. Leur capacité à muter par dérive et cassure antigénique est la principale contrainte à surmonter d'un point de vue thérapeutique (émergence de résistance vis-à-vis des antiviraux disponibles) et prophylactique. En effet, les vaccins actuels utilisant ces glycoprotéines comme antigène vaccinal, il est nécessaire de les réactualiser chaque année pour tenir compte de l'évolution des souches circulantes. Par ailleurs, ne pouvant prévoir les caractéristiques de la prochaine souche à potentiel pandémique, nous ne pouvons constituer un stock vaccinal en prévention de son émergence et, lorsque qu'elle apparaît, nous sommes limités par les délais de fabrication du vaccin.

Dans ce contexte, la protéine de matrice M2, de par son faible indice de mutation y compris sous pression vaccinale, représente un enjeu majeur en terme de vaccination dans de multiples espèces. L'objectif de cette étude était de valider dans le modèle murin que les vaccins M022 et M071 (virus myxomateux T1 recombinant exprimant le peptide M2e aviaire associé à l'une de ses protéines de surface) induisent une immunité protectrice de large spectre contre les influenza virus afin de l'appliquer ensuite au modèle « canard ». Cependant, aucune protection n'a pu être observée, aussi bien cliniquement que *via* l'activation cellulaire. Face à cet échec, plusieurs pistes ont été évoquées pour l'expliquer.

Dans un premier temps, tout en conservant l'idée générale d'un poxvirus exprimant le peptide M2, il faudrait modifier en partie le vaccin. On pourrait notamment abandonner le virus vecteur T1 au profit d'un virus atténué tel que SG33, qui est déjà utilisé comme vecteur vaccinal notamment chez les léporidés. De même, l'utilisation du domaine extracellulaire de la protéine M2 retrouvée dans la souche sauvage PR8, plutôt que la protéine aviaire, serait judicieuse dans la mesure où d'autres études ont déjà prouvé son efficacité chez des souris congéniques BALB/c. Même dans ce cas, il faudrait vérifier la structure tridimensionnelle des protéines M022-M2 et M071-M2 pour s'assurer que notre peptide est correctement présenté.

Dans un second temps, le protocole d'immunisation doit être adapté. La dose, la voie d'immunisation ainsi que l'ajout d'un adjuvant sont les trois points principaux à réévaluer. Il serait intéressant de tester l'effet d'une immunisation mucoale et, dans ce contexte, l'utilisation de chitosanes pourrait être à privilégier.

Pour finir, un nouveau vaccin a déjà été réalisé. Il combine le vecteur atténué SG33 au peptide M2 PR8. Bien que n'ayant pas encore les résultats des tests cellulaires, il apparaît déjà qu'il n'apporte pas de protection clinique dans la mesure où les épreuves de virulence se sont révélées négatives. L'étude de l'activation cellulaire pourrait apporter de plus amples informations permettant de comprendre à quel niveau ce vaccin fait défaut. D'autres constructions vaccinales pourraient à court terme se révéler efficaces, révolutionnant ainsi la démarche prophylactique visant à contrôler les gripes.

BIBLIOGRAPHIE

- * ALLISON A.C., BYARS N.E.
Syntex adjuvant formulation.
Research in Immunology, 1992, **143**, 5, 519-525
- * ARDANS A.A.
1999
Chapitre 68 : Orthomyxoviridae
In : HIRSH D.C., ZEE Y.C. Veterinary microbiology. Blackwell science Inc., 1999, 397-408
- * BAUMGARTH N., HERMAN O.C., JAGER G.C., *et al.*
B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection
J. Exp. Med., Juillet 2000, **192**, 2, 271-280
- * BETAKOVA T., HAY AJ.
Evidence that the CM2 protein of influenza C virus can modify the pH of the exocytic pathway of transfected cells.
J Gen Virol., Aout 2007, **88**, 2291-2296
- * BLACK R.A., ROTA P.A., GORODKOVA N., *et al.*
Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells.
J Gen Virol., Janvier 1993, **74**, 1, 143-146
- * BLANCOU J. (2007) La longue histoire des pestes aviaires, (page consultée le 04 octobre 2008) In : Site de l'académie vétérinaire de France, [en ligne].
Adresse URL : [<http://academieveterinaire.free.fr/fiche/historique.html>]
- * BRANDTZAEG P.
Overview of the mucosal immune system
Curr Top Microbial Immunol, 1989, **146**, 13-25
- * BROYLES S.S.
Vaccinia virus transcription
J Gen Virol., Septembre 2003, **84**, 2293-2303
- * BRUGERE-PICOUX J. (2006) L'influenza aviaire à virus hautement pathogène, (page consultée le 04 octobre 2008) In : Site de l'académie vétérinaire de France, [en ligne].
Adresse URL : [<http://academieveterinaire.free.fr/fiche/influenza.html>]
- * BUBLLOT M., PRITCHARD N., SWAYNE D.E., *et al.*
Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza.
Ann N Y Acad Sci., Octobre 2006, **1081**, 193-201

- * CAMERON C., HOTA-MITCHELL S., CHEN L., *et al.*
The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus
Virology, Novembre 1999, **264**, 2, 298-318
- *CAPUA I.
Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures
Rev. Sci. Tech. Off.int. Epiz., 2007, **26**, 2, 351-372
- * CAPUA I., ALEXANDER D.
Avian influenza vaccines and vaccination in birds
Vaccine, Septembre 2008, **26**, 4, D70-D73
- *CARRAT F., FLAHAUT A.
Influenza vaccine : The challenge of antigenic drift
Vaccine, Septembre 2007, **25**, 39-40, 6852-6862
- * CAVAILLON J.M.
Les cytokines
Paris : Masson, 1996, 589 p.
- * CHEN B., LESER G., JACKSON D., *et al.*
The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding.
Journal of Virology, Octobre 2008, **82**, 20, 10059-10070
- * COLE P.
Accelerating drug development and approval.
Drug News Perspect., Janvier-Fevrier 2010, **23**, 1, 37-47
- * COLLINS P.J., HAIRE L.F., LIN Y.P., *et al.*
Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses
Vaccine, Octobre 2009, **27**, 17, 6317-6323
- * CONGGANG L., HUAJUN Q., FEI P., *et al.*
Solid-state NMR characterization of conformational plasticity within the transmembrane domain of the influenza A M2 proton channel.
Biochimica et Biophysica Acta, Decembre 2007, **1768**, 12, 3162-3170
- * CROSS KJ, LANGLEY WA, RUSSELL RJ, *et al.*
Composition and functions of the influenza fusion peptide.
Protein Pept Lett., 2009, **16**, 7, 766-78.
- * DE JONG J.C. PALACHE A.M., BEYER W.E., *et al.*
Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus.
Dev Biol (Basel), 2003, **115**, 63-73.
- * DEREK GATHERER
The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context
Journal of clinical virology, Juillet 2009, **45**, 3, 174-178

- * DRAGHI M., PASHINE A., SANJANWALA B., *et al.*
NKp 46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection
J Immunol, 2007, **178**, 5, 2688-2698
- * DU Q.S., HUANG R.B., WANG S.Q., *et al.*
Designing inhibitors of M2 proton channel against H1N1 swine influenza virus.
PLoS One., Février 2010, **5**, 2
- * DUTEYRAT J.L., GELFI J., BERTAGNOLI S.
Le voyage du virus myxomateux, ou comment surfer sur la cellule
Virologie, Novembre 2002, **6**, 6, 465-467
- * EWEN C., KANE K.P., SHOSTAK I., *et al.*
A novel cytotoxicity assay to evaluate antigen-specific CTL responses using a colorimetric substrate for Granzyme B.
J Immunol Methods, Mai 2003, **276**, 1-2, 89-101
- * FARESS S., CARTER G., FERARRIS O., *et al.*
Divergent genetic evolution of hemagglutinin in influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001-2002.
Journal of Clinical Virologie, Juillet 2005, **33**, 3, 230-236.
- * FIERS W., DE FILETTE M., EL BAKKOURI K., *et al.*
M2e-based universal influenza A vaccine
Vaccine, Octobre 2009, **27**, 45, 6280-6283
- * FLEURY H.J.A
Virologie humaine
Elsevier Masson, 2009, 265 pages
- * GARCIA-SASTRE A., DURBIN R.K., ZHENG H., *et al.*
The role of interferon in influenza virus tissue tropism
J. Virol, Novembre 1998, **72**, 11, 8550-8558
- * GARCIA-SASTRE A.
Antiviral response in pandemic influenza viruses
Emerging infectious diseases, janvier 2006, **12**, 1, 44-47
- * GATHERER D.
The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context
Journal of Virologie, Juillet 2009, **45**, 3, 174-178
- * GERHARD W., MOZDZANOWSKA K., ZHARIKOVA D.
Prospects for universal influenza virus vaccine.
Emerg Infect Dis., Avril 2006, **12**, 4, 569-574

- * GHEBRE X.M., HAMMOND S.A., EPPERSON D.E., *et al.*
 Immunostimulant patch containing heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* enhances immune responses to injected influenza virus vaccine through activation of skin dendritic cells.
 J Virol., Mai 2003, **77**, 9, 5218-5225.
- * GHEDIN E., SENGAMALAY N., SHUMWAY M., *et al.*
 Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution.
 Nature, Octobre 2005, **437**, 7062, 1162-1166
- * GONG JZ, LIU Y, XU WF.
 Pharmacophore model of influenza neuraminidase inhibitors--a systematic review.
 Pharmazie, 2009 Oct, **64**, 10, 627-32.
- * GOUARIN S., VABRET A., DINA J., *et al.*
 Study of influenza C virus infection in France.
 J Med Virol., Août 2008, **80**, 8, 1441-1446
- * HAGENAARS N., MASTROBATTISTA E., GLANSBEEK H., *et al.*
 Head-to-head comparison of four nonadjuvanted inactivated cell culture-derived influenza vaccines : Effect of composition, spatial organization and immunization route on the immunogenicity in a murine challenge model.
 Vaccine, Decembre 2008, **26**, 51, 6555-6563
- * HAY A., GREGORY V., DOUGLAS A., *et al.*
 The evolution of human influenza viruses.
 Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Decembre 2001, **356**, 1416, 1861-1870
- * HGHIHGH I.H.R., READ L.R., MOHAMMADI H., *et al.*
 Characterization of host responses against a recombinant fowlpox virus-vectored vaccine expressing the hemagglutinin antigen of an avian influenza virus.
 Clin Vaccine Immunol., Mars 2010, **17**, 3, 454-463
- *HILGERS L.A.T., SNIPPE H.
 DDA as an immunological adjuvant.
 Research in Immunology, Juin 1992, **143**, 5, 494-503
- * HUBER V.C., LYNCH J.M., BUCHER D.J., *et al.*
 Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections.
 J Immunol., Juin 2001, **166**, 12, 7381-7388
- * HULEATT J., NAKAARA V., DESAIA P., *et al.*
 Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin
 Vaccine, Janvier 2008, **26**, 2, 201-214

- * JAMESON J., CRUZ J., ENNIS F.A.
Human cytotoxic T-lymphocyte repertoire to influenza A viruses.
J Virol., Novembre 1998, **72**, 11, 8682-8689
- * JASON R., JAMES J.
Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus.
Nature, Janvier 2008, **451**, 31, 591-595
- * JEANNOT A.C., HAMOUDI M., BOURAYOU N., *et al.*
Premiers cas de transmission secondaire en France du nouveau virus grippal d'origine porcine A(H1N1)
Médecine et maladies infectieuses, Janvier 2010, **40**, 1, 48-50
- * JEGERLEHNER A., SCHMITZ N., STORNI T., *et al.*
Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity.
J Immunol, 2004, **172**, 5598-5605
- * JENSEN F.C., SAVARY J.R., DIVELEY J.P., *et al.*
Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant.
Adv Drug Deliv Rev., Juillet 1998, **32**, 3, 173-186
- * JOHANSSON B.E., BUCHER D.J., KILBOURNE E.D.
Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection.
J Virol., Mars 1989, **63**, 3, 1239-1246
- * JOSSET L., FROBERT E., ROSA-CALATRAVA M.
Influenza A replication and host nuclear compartments: Many changes and many questions
Journal of Clinical Virology, Decembre 2008, **43**, 4, 381-390
- *KALETA E.F., HERGARTEN G., YILMAZ A.
Avian influenza A viruses in birds – an ecological, ornithological and virological view.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., Décembre 2005, **112**, 448-456.
- * KERR P.J., JACKSON R.J.
Myxoma virus as a vaccine vector for rabbits: antibody levels to influenza virus haemagglutinin presented by a recombinant myxoma virus.
Vaccine, Décembre 1995, **13**, 17, 1722-1726
- * KIM A.H., DIMITRIOU I.D., HOLLAND M.C., *et al.*
Complement C5a receptor is essential for the optimal generation of antiviral CD8+ T cell response
J Immunol., Août 2004, **173**, 4, 2524-2529
- * KIM P.S., AHMED R.
Features of responding T cells in cancer and chronic infection.
Curr Opin Immunol., 2010, **22**, 1-8

* La grippe aviaire et sa transmission chez l'homme (page consultée le 4 octobre 2009) In :
www.futura-santé.com [en ligne]

http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p4/#

* LALOR P.A., WEBBY R.J., MORROW J., *et al.*

Plasmid DNA-based vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza virus.

J Infect Dis., Juin 2008, **197**, 12, 1643-1652

* LAVER G., GARMAN E.

Pandemic influenza: its origin and control.

Microbes and infection, Novembre 2002, **4**, 13, 1309-1316

* LAWRENCE H.P., ROBERT A.L.

The M2 proton channels of influenza A and B viruses

The journal of biological chemistry, Avril 2006, **281**, 14, 8997-9000

* LOEVENBRUCK C. (2008) Glissement antigénique (page consultée le 05 octobre 2009)

In : Acces.inrp.fr

http://acces.inrp.fr/acces/recently_published?month:int=8&b_start:int=2285&year:int=2011

* LU J., LIU D., LIU W., *et al.*

Genetic stability and linkage analysis of the 2009 Influenza A(H1N1) virus based on sequence homology.

Arch Virol., 2009, **154**, 12, 1883-1890.

* LÜTTICKEN D., SEGERS R.P.A.M., VISSER N.

Veterinary vaccines for public health and prevention of viral and bacterial zoonotic diseases

Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2007, **26**, 1, 165-177

* MACIEJ F.B.

Vaccination and antigenic drift in influenza

Vaccine, Juillet 2008, **26**, 3, C8-C14

* MARLIER D., MAINIL J., BOUCRAUT-BARALON C., *et al.*

The efficacy of two vaccination schemes against experimental infection with a virulent amyxomatous or a virulent nodular myxoma virus strain.

J Comp Pathol., Février-Avril 2000, **122**, 2-3, 115-122

* McCABE V.J., TARPEY I., SPIBEY N.

Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein.

Vaccine, Juin 2002, **20**, 19-20, 2454-2462

* McELHANEY J.E., EWEN C., ZHOU X., *et al.*

Granzyme B: Correlates with protection and enhanced CTL response to influenza vaccination in older adults.

Vaccine, Avril 2009, **27**, 18, 2418-2425

- * McFADDEN G., GRAHAM K., ELLISON K., *et al.*
Interruption of cytokine networks by poxviruses: lessons from myxoma virus.
J Leukoc Biol., Mai 1995, **57**, 5, 731-738
- * MIV (Macroepidemiology of Influenza Vaccination Study Group)
The macro-epidemiology of influenza vaccination in 56 countries, 1997--2003.
Vaccine, Octobre 2005, **23**, 44, 5133-5143
- * MORENS D., JEFFERY M.D., TAUBENBERGER K.
The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus
The new England journal of medicine, Juin 2009, **361**, 225-229
- * MOSS B., CARROLL M.W., WYATT L.S., *et al.*
Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates.
Adv Exp Med Biol., 1996, **397**, 7-13
- * MOZDANOWSKA K., ZHARIKOVA D., CUDIC M., *et al.*
Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered
by a synthetic matrix protein 2-based
Viro J, Octobre 2007, 4, 118
- * MULLER A., SILVA E., ABRANTES J., *et al.*
Partial sequencing of recent Portuguese myxoma virus field isolates exhibits a high degree of
genetic stability.
Vet Microbiol., Janvier 2010, **140**, 1-2, 161-166
- * MURPHY B.R., CLEMENTS M.L.
The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus.
Curr Top Microbiol Immunol., 1989, **146**, 107-116
- * MUTWIRI G., GERDTS V., LOPEZ M., *et al.*
Innate immunity and new adjuvants
Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2007, **26**, 1, 147-156
- * National Institutes of Health News, Dynasty: Influenza Virus in 1918 and Today (page
consultée le 23 octobre 2009) In : Site of National Institute of Allergy and
Infectious Diseases , [en ligne]
http://www3.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2009/dynasty_flu.htm
- * NEIRYNCK S., DEROO T., SAELENS X., *et al.*
A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein.
Nature medicine, Octobre 1999, **5**, 10, 1157-1163
- * NG A. K-L., WANG J-H., SHAW P-C.
Structure and sequence analysis of influenza A virus nucleoprotein.
Sci China C Life Sci., Mai 2009, **52**, 5, 439-49.
- * NICKLAS W.
Aluminum salts.
Research in Immunology, Juin 1992, **143**, 5, 489-494

- * OKEKE M.I., NILSSEN O., TRAAVIK T.
Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines.
J Gen Virol., Janvier 2006, **87**, 1, 21-27
- * OKUDA K., IHATA A., WATABE S., *et al.*
Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene.
Vaccine, Juin 2001, **12**, 27, 3681-3691
- * OMS grippe aviaire février 2006 (page consultée le 15 octobre 2008) In : Site de l'Organisation Mondiale de la Santé , [en ligne].
Adresse URL : [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/fr/index.html]
- * OMS Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO (page consultée le 15 octobre 2008) In : Site de l'Organisation Mondiale de la Santé , [en ligne].
Adresse URL : [http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_09_10/en/index.html]
- * OMS grippe pandémique H1N1 2009 (page consultée le 21 aout 2009) In : Site de l'Organisation Mondiale de la Santé , [en ligne].
Adresse URL : [<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/fr/>]
- * OSTERHAUS A., RIMMELZWAAN G., MARTINA B., *et al.*
Influenza B virus in seals.
Science, Mai 2000, **288**, 4568, 1051-1053
- * OWEN R.E., YAMADA E., THOMPSON C.I., *et al.*
Alteration in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 virus are associated with reduce natural killer cell lysis of infected cells
J Virol., 2007, **81**, 20, 11170-11178
- * PAOLETTI E., TAYLOR J., MEIGNIER B., *et al.*
Highly attenuated poxvirus vectors: NYVAC, ALVAC and TROVAC.
Dev Biol Stand., 1995, **84**, 159-163
- * PARHAM P., OHTA T.
Population Biology of Antigen Presentation by MHC Class I Molecules
Science, Avril 1996, **272**, 5258, 67-74
- * PIGNOLET B., DUTEYRAT J.L., ALLEMANDOU A., *et al.*
In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains.
Virol J., Septembre 2007, **4**, 94
- * PIGNOLET B. BOULLIER S., GELFI J., *et al.*
Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants.
J Gen Virol., Juin 2008, **89**, 6, 1371-1379

* Représentation schématique des leporipoxvirus (page consultée le 7 octobre 2009) In : Viral Zone [en ligne]

Adresse URL : [http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/153.html]

* RAMMENSEE H.G., FALK K., ROTZSCHKE O.
Peptides naturally presented by MHC class I molecules.
Annu Rev Immunol., 1993, **11**, 213-244

*RAMMENSEE H.G., BACHMANN J., EMMERICH N.K., *et al.*
SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.
Immunogenetics, 1999, **50**, 213-219
(access via : www.syfpeithi.de)

* RAO X., COSTA A.I., VAN BAARLE D., *et al.*
A comparative study of HLA binding affinity and ligand diversity: implications for generating immunodominant CD8+ T cell responses.
J Immunol., Février 2009, **182**, 3, 1526-1532

* RIMMELZAAN G.F., BOON A.C., VOETEN J.T., *et al.*
Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes.
Virus Res., Juillet 2004, **103**, 1-2, 97-100

* RIZZA P., FERRANTINI M., CAPONNE I., *et al.*
Cytokines as natural adjuvants for vaccines: where are we now?
Trends Immunol., Août 2002, **23**, 8, 381-383

* ROBERTS K.L., SMITH G.L.
Vaccinia virus morphogenesis and dissemination.
Trends Microbiol., Octobre 2008, **16**, 10, 472-479

* ROITT I., BROSTOFF J., MALE D.
Immunologie 3^e édition. Traduction de la 6^e édition anglaise par Pierre L. Masson
Bruxelle : De Boeck & Larcier s.a., 2002, 480 p.

* SCHAECHTER M., MEDOFF G., EISENSTEIN B.I.
Microbiologie et pathologie infectieuse
Bruxelle : De Boeck Université, 1999, 1000P.

* SCHLEINITZ N., HAMIDOU M., VELY F., *et al.*
Les cellules natural killer : acquisitions récentes et implication en pathologie humaine
La Revue de Médecine Interne, Juin 2006, **27**, 6, 465-472

* SCHOTSAERT M., DE FILETTE M., FIERS W., *et al.*
Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments
Expert Rev Vaccines., Avril 2009, **8**, 4, 499-508

- * SLEPUSHKIN V. A., KATZ J. M., BLACK R. A., *et al.*
Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein
Vaccine, 1995, **13**, 15, 1399-1402
- * STEENSELS M., BUBLLOT M., BORM S.V., *et al.*
Prime-boost vaccination with a fowlpox vector and an inactivated avian influenza vaccine is highly immunogenic in Pekin ducks challenged with Asian H5N1 HPAI
Vaccine, Janvier 2009, **27**, 5, 646-654
- * SUI Z., CHEN Q., WU R., *et al.*
Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M2-based vaccine with chitosan as an adjuvant.
Arch Virol., Février 2010
- * SWAYNE D.E.
Avian influenza vaccines and therapies for poultry
Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Juillet 2009, **32**, 4, 351-363
- * TAKAHASHI Y.
Memory B Cells in Systemic and Mucosal Immune Response: Implications for Successful Vaccination
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, **71**, 10, 2358-2366
- * TAMURA S., TANIMOTO T., KURATA T.
Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines.
Jpn J Infect Dis., Août 2005, **58**, 4, 195-207
- * TANG Y., ZAITSEVA F., LAMB R.A., *et al.*
The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue.
J Biol Chem., Octobre 2002, **277**, 42, 39880-39886
- * TOMPKINS S.M., ZHAO Z.S., LO C.Y., *et al.*
Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1.
Emerg Infect Dis., Mars 2007, **13**, 3, 426-435
- * TREANOR J.J., TIERNEY E.L., ZEBEBEE S.L., *et al.*
Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice.
J Virol., Mars 1990, **64**, 3, 1375-1377
- * TRIA F., LASSIG M., PELITI L., *et al.*
A minimal stochastic model for influenza evolution.
J. Stat. Mech. 2005, P07008.
- * TULP A., VERWOERD D., DOBBERSTEIN B., *et al.*
Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment.
Nature, Mai 1994, **369**, 6476, 120-126

- * VAN DEN BERG T., LAMBRECHTA B., MARCHE S., *et al.*
Influenza vaccines and vaccination strategies in birds
Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, Mars 2008, **31**, 2-3, 121-165
- * VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., *et al.*
Virus taxonomy : seventh report of the International Committee on taxonomie of viruses
Academic Press (San Diego - USA), 2000, 1162p.
- *VANDERPLASSCHEN A., HOLLINSHEAD M., SMITH G.L., *et al.*
Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms.
Journal of General Virology, 1998, **79**, 4, 877-887
- * VENKATARAMAN P., LAMB R.A., PINTO L.H.
Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus
J Biol Chem., Juin 2005, **280**, 22, 21463-21472
- * WANG J.P., LIU P., LATZ E., *et al.*
Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key element of TLR7 signaling beyond endosomal recognition
J Immunol, Novembre 2006, **177**, 10, 7114-7121
- * WATANABE Y., WATARI E., MATSUNAGA I., *et al.*
BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components.
Vaccine, Juillet 2006, **24**, 29-30, 5700-5707
- *WHITE M.R., DOSS M., BOLAND P., *et al.*
Innate immunity to influenza virus: implications for future therapy.
Expert Rev Clin Immunol., Juillet 2008, **4**, 4, 497-514
- * WHO expert comitee
A revised system of nomenclature for influenza viruses.
Bull World Health Organ. 1971, **45**, 1, 119-24
- * WICKER S., RABENAU H.F., KEMPF V.A., *et al.*
Vaccination against classical influenza in health-care workers: self-protection and patient protection.
Dtsch Arztebl Int., Septembre 2009, **106**, 36, 567-572
- * WU F., HUANG J., YUAN X., *et al.*
Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus.
Vaccine, Decembre 2007, **25**, 52, 8868-8873
- * YEWDELL J.W., BENNINK J.R., SMITH G.L., *et al.*
Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A., Mars 1985, **82**, 6, 1785-1789.

* ZACHERTOWSKA A., BREWER D., EVANS D.H.

Characterization of the major capsid proteins of myxoma virus particles using MALDI-TOF mass spectrometry.

J Virol Methods., Mars 2006, **132**, 1-2, 1-12

* ZEBEBEE S.L., LAMB R.A.

Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions.

J Virol., Août 1988, **62**, 8, 2762-2772

* ZUNIGA M.C.

Lessons in détente or know thy host: the immunomodulatory gene products of myxoma virus.

J Biosci., Avril 2003, **28**, 3, 273-285