



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 : 8638

To cite this version :

Albin, Edith. *Etude de l'immunogénicité en modèle murin de la protéine VP2 du virus Bluetongue exprimée en fusion avec des protéines d'enveloppe du virus myxomateux (souche SG33)*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 105 p.

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

ANNEE 2012 THESE : 2012 – TOU 3 – 4077

ETUDE DE L'IMMUNOGENECITE EN MODELE MURIN DE LA PROTEINE VP2 DU VIRUS BLUETONGUE EXPRIMEE EN FUSION AVEC DES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VIRUS MYXOMATEUX (SOUCHE SG33)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2012
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

ALBIN Edith, Claire

Née, le 03 décembre 1987 à Montauban (82)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI

Mme Séverine BOULLIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE 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. DORCHIES
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. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **SCHELCHER 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. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
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. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- 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

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- 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 **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*

M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*

Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*

M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*

Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse,

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Professeur à l'Université Toulouse III Paul Sabatier

Praticien hospitalier

Virologie

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

Hommages respectueux.

Aux membres du jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie-Infectiologie

Qui nous a fait l'honneur de superviser ce travail,

Pour m'avoir guidée tout au long de ce travail, pour sa patience, sa pédagogie, sa disponibilité, sa gentillesse,

Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Séverine Boullier

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail,

Sincère reconnaissance.

Remerciements à tous les membres du laboratoire de virologie IHVV ENVT pour m'avoir aidée de près ou de loin dans ce travail et pour la bonne humeur régnant dans ce service.

Un très grand merci spécialement à Kunta pour son aide si précieuse et le temps consacré à ce travail, dans la bonne humeur en toutes circonstances.

DEDICACES

A ma famille si soudée à qui je dois tant dans la vie...

A mes parents formidables, Papa Maman, merci pour votre immense amour, votre soutien tout au long de mon parcours! Merci pour tout !

A ma sœur Ingrid pour tout son amour, ses encouragements, ses conseils et sa présence de grande sœur protectrice.

A mon frerot Eric pour tout son amour, pour son Einstein attitude, sa bonne humeur !

A Tanguy pour son amour, sa patience, ses attentions tous les jours, que du bonheur...

A Mika et Maé, pour tous les bons moments en famille.

A la famille Bleut Bleut, Tat', Tonton, Mathilde et Aurélien, pour tous les bons moments passés ensemble, vos encouragements et surtout votre amour débordant.

A ma Marraine qui m'a toujours encouragée et est toujours présente pour me témoigner de son amour et de son réconfort.

A mon Parrain pour son amour et sa bonne humeur éclatante !

A Bilou et Ninou pour leur amour.

Merci à tous les autres membres de ma famille pour leurs encouragements.

A Céline et Guillem, pour toutes ces années passées ensemble, pour votre soutien et pour tous les bons moments !

A Célia et Angé pour leur amitié depuis tant d'années malgré la distance.

A Miré, incroyable membre du trio de choc de A4, pour tous les bons souvenirs ensemble. Que notre amitié perdure malgré le froid du nord qui nous sépare.

A Cécile, pour ton accent ch'ti, ta bonne humeur et tes blagues. Que les ch'tis ne te gardent pas trop loin dans le nord et que tu reviennes vite avec maxou bébé.

A Pocket, à notre amitié et la chaleur calédonienne que tu dégages avec ta bonne humeur ! Je te souhaite plein de bonheur à Nouméa mais reviens souvent nous voir !

A Sophie « la Jugant », Pierre et Foxy, pour notre amitié, notre complicité en duo de A5 et pour tous ces agréables moments en votre compagnie.

A Lola pour sa Lola attitude et son amitié. Que Paris t'apporte beaucoup de bonheur avant d'atterrir encore dans je ne sais quel coin du monde.

A Hélène pour les bons moments ensemble. Que le Québec et les caribous t'apportent beaucoup de bonheur !

A Sandra, Magali, Charlotte, Cécé, Vanessa, Marjo, Sandrine, Marie, Laura, Makakos, Fafache et tous ceux avec qui j'ai passé d'agréables moments à l'ENVT ou ailleurs.

TABLE DES MATIERES

TABLES DES ILLUSTRATIONS	15
LISTE DES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION – CADRE DE LA THESE	19
PARTIE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I. Utilisation de vecteurs vaccinaux en médecine vétérinaire : généralités	21
1.1. Enjeux et intérêts de la vaccination.....	21
1.2. Rappels immunologiques-réponse anti-virale.....	21
1.2.1. L'immunité non spécifique, première ligne de défense	21
1.2.2. L'immunité spécifique.....	22
a. Réaction à médiation cellulaire	22
b. Réaction à médiation humorale.....	23
1.3. Critères recherchés en vaccinologie vétérinaire.....	24
1.4. Différents types de vaccins	24
1.4.1. Vaccins vivants.....	25
1.4.2. Vaccins inertes.....	25
1.4.3. Vaccins intermédiaires	25
1.5. Intérêts des vaccins recombinants produits par génie génétique	26
II. La Fièvre Catarrhale Ovine	27
2.1. Etiologie	27
2.2. Epidémiologie	27
2.2.1. Transmission vectorielle.....	27
2.2.2. Autres moyens de transmission	29
2.2.3. Situation mondiale.....	30
2.3. Structure du virus	32
a. Les protéines mineures.....	32
b. Les protéines majeures	33
2.4. Sérotypes et variabilité génétique	33
2.5. Cycle de réplication	34
2.6. Pathogénie et rappels immunologiques	35
2.6.1. Pathogénie cellulaire et immunité non spécifique.....	36
2.6.2. Immunité spécifique	37
a. Réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	37
b. Réponse immunitaire à médiation humorale.....	37
c. Immunité du fœtus	38
2.7. Symptômes et lésions de la maladie	38
2.7.1. Chez les ovins.....	38
2.7.2. Chez les bovins.....	39
2.7.3. Chez les caprins	40

2.7.4.	Les lésions	40
2.8.	Diagnostic	41
2.8.1.	Epidémio-clinique	41
2.8.2.	De laboratoire	41
a.	Diagnostic virologique	41
b.	Diagnostic sérologique	41
2.9.	Prophylaxie	42
2.9.1.	Sanitaire	42
2.9.2.	Médicale : vaccination	42
a.	Les vaccins actuels	43
b.	Vaccins émergents.....	43
-	Les Pseudoparticules virales ou VLPs « Virus-like particles »	43
-	Les vaccins recombinants.....	44
-	Autres : vaccins à virus « défectueux » ou vaccins « disabled infectious single cycle ».....	44
III.	Les poxvirus, vecteurs vaccinaux de choix	45
3.1.	Classification.....	45
3.2.	Structure	45
3.3.	Génome	46
3.4.	Cycle viral	47
3.4.1.	Entrée du virus dans la cellule.....	47
3.4.2.	Expression des gènes viraux.....	47
3.4.3.	Assemblage – maturation – libération des virions.....	47
3.5.	Utilisation des poxvirus en tant que vecteurs recombinants	48
3.5.1.	Intérêts/Atouts	48
3.5.2.	Limites	49
3.5.3.	Quelques exemples en médecine vétérinaire.....	49
a.	Les Orthopoxvirus.....	49
b.	Les Avipoxvirus	49
c.	Les Capripoxvirus	50
3.5.4.	Le <i>Myxoma virus</i> : un poxvirus vecteur prometteur.....	50
IV.	Etat des lieux actuel sur l'utilisation en recherche de la stratégie de fusion avec expression de la protéine d'intérêt sur l'enveloppe de la particule virale.....	51
4.1.	Utilisation des poxvirus en tant que vecteur chimère	51
4.1.1.	Antigène du HIV- Human immunodeficiency virus	51
4.1.2.	Antigène du virus Ebola	52
4.1.3.	Antigène de <i>Yersinia pestis</i> (Peste)	53
4.1.4.	Antigène du virus Influenza aviaire et GFP (Green Fluorescent Protein).....	53
4.2.	Utilisation de vecteurs autres que poxviraux en tant que vecteur chimère	54
4.2.1.	Vecteur de la famille des <i>Paramyxoviridae</i>	54
a.	Vecteur virus de la maladie de Newcastle (NDV) contre l'herpesvirus bovin (BHV-1).....	54

b.	Vecteur Parainfluenza contre le virus Ebola	54
4.2.2.	Vecteur de la famille des <i>Rhabdoviridae</i>	55
a.	Vecteur du genre Lyssavirus	55
b.	Vecteur du genre Vesiculovirus	57
4.2.3.	Vecteur de la famille des <i>Orthomyxoviridae</i>	58
PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE		61
I.	Principe de construction des virus recombinants	61
1.1.	Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 - VP2	61
1.1.1.	Construction et structure des plasmides de transfert	61
1.1.2.	Obtention et structure des virus recombinés.....	62
1.1.3.	Contrôle de l'expression des gènes étrangers insérés.....	62
1.2.	Principes de construction des virus recombinés myxomateux SG33 M022L-VP2 et SG33 M071L-VP2	63
1.2.1.	Construction et structure des plasmides de transfert.	63
a.	Construction de M071L-VP2	63
b.	Construction de VP2-M022L	63
1.2.2.	Obtention et structure des virus recombinés.....	63
1.2.3.	Contrôle de l'expression des gènes étrangers insérés.....	63
II.	Matériel et méthodes	64
2.1.	Protocole vaccinal	64
2.1.1.	Lots expérimentaux de souris	64
2.1.2.	Interventions	65
2.2.	Préparation des splénocytes	66
2.2.1.	Prélèvement des rates	66
2.2.2.	Purification des splénocytes	66
2.3.	Protocole d'analyse de la réponse cellulaire	67
2.3.1.	Choix des peptides VP2 pour les stimulations des splénocytes	67
2.3.2.	Mise en culture des cellules.....	67
a.	Stimulation pour le marquage intracellulaire	67
b.	Stimulation pour les ELISA (dosage des cytokines produites par les lymphocytes CD4+).....	68
c.	Marquage et stimulation pour le CFSE (étude de la prolifération des lymphocytes)	68
d.	Marquage intracellulaire	69
2.3.3.	Protocole ELISA.....	69
2.4.	Protocoles d'analyse de la réponse humorale (immunofluorescence).....	70
2.4.1.	Infection à J0	70
2.4.2.	Fixation des cellules à J2	70
2.4.3.	Perméabilisation à J3	70
2.4.4.	Marquages	71

III. Résultats	71
3.1. Analyse de la réponse humorale, tests d'immunofluorescence	71
3.2. Analyse de la réponse cellulaire.....	80
3.2.1. Marquage intracellulaire	80
a. CD3+IL2+	81
b. CD3+ IFN γ +.....	83
3.2.2. Test ELISA	86
3.2.3. CFSE.....	87
DISCUSSION	91
CONCLUSION	95
Bibliographie	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de la réponse immunitaire antivirale.....	24
Figure 2: Classification des vaccins conventionnels et recombinants d'après Eloit M., 1998.	26
Figure 3: Diversité des Culicoides capturés en France métropolitaine (continent et Corse) par le réseau de surveillance entomologique en 2010.	28
Figure 4: Les différents mécanismes envisageables d'Overwintering.	30
Figure 5: Structure du virus de la Bluetongue.	33
Figure 6: Représentation de la variabilité génétique et la proximité antigénique des différents sérotypes du virus de la Bluetongue.....	34
Figure 7: Cycle viral du BTV.....	35
Figure 8: Schéma pathogénique du BTV chez les ruminants.	36
Figure 9: Structure générale des Leporipoxvirus.	46
Figure 10: Représentation schématique du génome des Poxvirus. Exemple du virus de la Vaccine.....	46
Figure 11: Le cycle de réplication des Poxvirus.	48
Figure 12: Structure générale de la glycoprotéine G du virus de la rage et de la protéine de fusion RV RBD-ED51.	56
Figure 13: Structure générale de la glycoprotéine G du virus de la rage et de la protéine de fusion HC50/A-E30.....	57
Figure 14: Structure générale de l'hémagglutinine HA du virus Influenza et des protéines de fusion Influenza-RBD et Influenza-LEF.....	59
Figure 15: Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 - VP2.....	62
Figure 16: Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 M071L-VP2... ..	64
Figure 17: Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 VP2-M022L... ..	64
Figure 18: Représentation schématique du protocole vaccinal pour la première série de souris.	65
Figure 19: Représentation schématique du protocole vaccinal pour la deuxième série de souris.	66
Figure 20: Principe du marquage intracellulaire.....	80
Figure 21: Marquage intracellulaire IFN gamma et IL-2 pour les souris témoins négatifs stimulées PMA-Ionomycine.....	81
Figure 22: Marquage intracellulaire IL-2 des cellules stimulées par le pool de peptides VP2 selon l'origine de la souris.	82
Figure 23: Marquage intracellulaire IL-2 et fenêtre de sélection pour s'affranchir de la réponse non spécifique.	82
Figure 24: Marquage intracellulaire IFN gamma des cellules stimulées par le pool de peptides VP2 selon l'origine de la souris.	84
Figure 25: Marquage intracellulaire IFNg et fenêtre de sélection pour s'affranchir de la réponse non spécifique.	85
Figure 26: Principe du CFSE.	87

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IL-2 selon l'origine des souris et le type de stimulation.	81
Graphique 2: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IL-2 selon l'origine des souris et le type de stimulation, après sélection ciblée en vue de s'affranchir d'une réponse non spécifique avec les peptides VP2.	83
Graphique 3: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IFN gamma selon l'origine de la souris et le type de stimulation.	84
Graphique 4: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IFNg selon l'origine des souris et le type de stimulation, après sélection ciblée en vue de s'affranchir d'une réponse non spécifique avec les peptides VP2.	85
Graphique 5: Production d'IL-2 par les splénocytes selon leur stimulation et la vaccination des souris dont ils sont issus.	87
Graphique 6: Pourcentage de prolifération des cellules CD4+ selon la vaccination des souris et la stimulation de leurs splénocytes.	88
Graphique 7: Profils de division par marquage CFSE des lymphocytes CD4+ selon la vaccination des souris et la stimulation de leurs splénocytes.	89

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1: <i>Culicoides imicola</i>	27
Photo 2: Ptyalisme signant la présence de lésions buccales.	39
Photo 3: Volumineux oedème sous glossien.	39
Photo 4: Ulcère étendu du bourrelet coronaire, pétéchies dans la corne.	39
Photo 5: Congestion du nez, érosions et fissures de la peau, croûtes cicatricielles.	39
Photo 6: Gros ulcère sur la face interne de la lèvre supérieure; hémorragies périphériques... ..	39
Photo 7: Erythème péri oculaire associé à une congestion des muqueuses.	40
Photo 8: Ulcérations du museau.	40
Photo 9: Ulcères de la cavité buccale.	40
Photo 10: Lésions ulcératives sur les trayons.	40
Photo 11: Photographies réalisées par une caméra des différents degrés de fluorescence au microscope à immunofluorescence (x10) selon les sérums utilisés.	78
Photo 12: Photographies réalisées par un appareil photographique des différents degrés de fluorescence au microscope à immunofluorescence (x10) selon les sérums utilisés.	79
Photo 13: Photographies réalisées au microscope confocal des différents degrés de fluorescence selon les sérums utilisés.	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques du diagnostic virologique et sérologique.	42
Tableau 2: Classification de la famille des Chordopoxvirinae.	45
Tableau 3: Répartition des souris dans chaque cage.	65
Tableau 4: Représentation des résultats de lecture de fluorescence obtenus sur cellules non infectées avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).	72
Tableau 5: Représentation des résultats de lecture de fluorescence obtenus sur cellules infectées BTV-8 avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).	73
Tableau 6: Représentation des résultats de lecture de fluorescence obtenus sur cellules infectées SG33 avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).	73
Tableau 7: Représentation des résultats de lecture de fluorescence sur cellules infectées BTV-8 avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).	75
Tableau 8: Représentation des résultats de lecture de fluorescence sur des cellules infectées BTV-8 avec des sérums récoltés à Jfinal ou à J0.	77
Tableau 9: Pourcentages de souris testées présentant une immunofluorescence à la dilution 1/500ème sur cellules infectées BTV-8 (sérum Jfinal) selon leur cage d'origine.	78
Tableau 10: Résultats des séroneutralisations.	80

LISTE DES CARTES

Carte 1: Répartition mondiale de la FCO.	30
Carte 2: Répartition mondiale des différents sérotypes du virus de la Bluetongue.	30
Carte 3: Voies de progression des épizooties en Europe.	31
Carte 4: Répartition géographique en Europe des régions touchées par le BTV entre le 01/05/2011 et le 13/02/2012.	32
Carte 5: Répartition géographique en Europe des régions touchées par le BTV entre le 01/05/2010 et le 01/07/2011.	32

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorps	Kb : 1000 paires de bases
ADN : acide désoxyribonucléique	LB : Lymphocytes B
Ag : Antigène	LC : Light chain
ANOVA : analyse de variance	LEF : lethal and edema factor ou facteur létal et oedématogène
ARN : acide ribonucléique	LT : Lymphocytes T
ARNm : acide ribonucléique messenger	LT $\gamma\delta$: Lymphocyte avec un récepteur fait d'une chaîne γ et d'une chaîne δ
BTV : Bluetongue virus ou Virus de la bluetongue	LTc : Lymphocytes T cytotoxiques
BVH-1 : Bovine herpesvirus 1 ou Herpesvirus bovin 1	LTh : Lymphocytes T helper ou auxiliaires
CFSE : Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester	MHD : maladie hémorragique virale du lapin
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	mL : milliLitre
Con A : Concanavalin A	mM : milliMolaire
CPA : Cellules présentatrices d'antigène	MOI : multiplicity of infection ou multiplicité d'infection
DIVA : Distinction between Infected and Vaccinated Animals, ou distinction entre animaux infectés et vaccinés	MPA : acide mycophénolique
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium ou milieu essentiel modification minimum de dubbelco	MVA : Modified Vaccinia Ankara ou souche Ankara du virus de la vaccine
EBOV : Ebola virus ou virus Ebola	NDV : Newcastle disease virus ou virus de la maladie de Newcastle
Ecogpt : <i>E. coli</i> xanthine-guanine phosphoribosyltransférase	PA : Protector Antigen ou antigène protecteur
EDTA : Acide Ethylene Diamine Tétracétique	PBS : phosphate buffer solution ou Tampon phosphate salin
EEV : Virus extracellulaire enveloppé	PCR : Polymerase chain reaction ou Amplification par la polymérase
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	PFU : plaque forming unit
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	PMA-Iono : phorbol 12-myristate 13-acetate – Ionomycine
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting	RBD : Receptor Binding Domain
FCO : Fièvre catarrhale ovine	RIT : Répétition inversée terminale
GFP : Green Fluorescent Protein	RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction ou transcription inverse et amplification par la polymérase
GP : Glycoprotéine	RV : Rabies virus ou virus de la rage
HA : Hémagglutinine	SHIV : Simian-Human Immunodeficiency virus ou virus simien-humain de l'immunodéficience
HC : Heavy chain	SVF : Sérum Fœtal de Veau
HIV : virus de l'immunodéficience humaine	TLR : Toll Like Receptor
HPIV-3 : <i>Parainfluenza</i> de type 3	VACV ou VV : Vaccinia virus ou virus de la vaccine
IEV : Virus intracellulaire enveloppé	VLP : Virus like particles
IFN : Interféron	VM ou MYXV : virus myxomateux
IL2 : Interleukine	VSV : Vesicular stomatitis virus ou virus de la stomatite vésiculeuse
IMV : Virus intracellulaire mature	
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique	
J : Jour	

INTRODUCTION – CADRE DE LA THESE

Dans un souci constant d'optimiser la réponse immunitaire dans le domaine de la vaccinologie, l'équipe INRA-ENVV IHVV (Intéraction Hôtes-Virus et vaccinologie) au sein de l'UMR Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP) a mis au point de nouveaux vecteurs dérivés des *Leporipoxvirus*. Cette invention est protégée par un brevet déposé aux Etats-Unis [Bertagnoli *et al.*, 2011]. Ces nouveaux vecteurs expriment l'antigène d'intérêt fusionné avec une protéine d'enveloppe du virus, permettant ainsi sa présentation à la surface de la particule virale. Cette équipe a identifié deux protéines d'enveloppe des *Leporipoxvirus* (M071L et M022L) qu'il est possible de fusionner avec un antigène d'intérêt sans que cela n'altère leurs fonctions.

Cette nouvelle approche vaccinale a été testée avec deux antigènes de taille différente, en fusion avec M071L ou M022L :

- le peptide correspondant à l'ectodomaine de la protéine M2 (M2e) du virus Influenza. Les deux constructions ont déjà prouvé leur innocuité *in vivo* (souris, moutons, lapins) et l'induction d'une réponse humorale spécifique contre M2e chez le lapin et la souris.
- la protéine immunogène VP2 du virus Bluetongue BTV8. Malgré la taille importante de cet antigène (960 acides aminés), les fusions obtenues se sont avérées stables et le rôle des protéines porteuses de l'antigène ne semble pas altéré. L'administration de ces vecteurs viraux recombinants à des lapins (vecteur répliquatif chez cette espèce) a permis de montrer que l'immunogénicité de la protéine VP2 semblait bien conservée car les sérums récoltés étaient positifs en immunofluorescence.

Le virus Bluetongue responsable de la fièvre catarrhale ovine (FCO) a été la source de pertes économiques très importantes durant ces dernières années en Europe. L'élaboration de vaccins efficaces était donc nécessaire. A ce jour, des vaccins sont déjà commercialisés mais la volonté de réaliser des vaccins de plus en plus performants pousse à s'orienter vers de nouvelles stratégies d'élaboration. De plus, la vaccination n'étant plus rendue obligatoire sur le territoire, la France n'est pas à l'abri d'une réémergence de la maladie.

Afin d'évaluer l'innocuité de ces recombinants et de vérifier si la technique de fusion permet de conférer une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifiques, ils ont été testés dans un modèle murin, espèce non sensible du BTV. Les résultats obtenus vont être présentés dans ce travail de thèse.

PARTIE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Avant d'évoquer la maladie contre laquelle nous souhaitons optimiser la réponse immunitaire grâce à des vaccins utilisant la technique de fusion, il paraît nécessaire de faire quelques rappels de vaccinologie. En effet, il existe actuellement différents types de vaccins et les enjeux et critères recherchés dans le domaine vétérinaire sont bien particuliers. Ainsi, après avoir abordé ces notions, nous présenterons la maladie proprement dite de la fièvre catarrhale ovine à laquelle, dans ce travail, nous nous intéresserons. Ce sera l'occasion de rappeler les critères immunologiques de la FCO à prendre en compte pour l'élaboration de vaccins et de porter un intérêt aux spécialités actuellement sur le marché. Nous verrons qu'il en existe en cours d'étude dites de « nouvelle génération » et que la famille des *Poxviridae* est prometteuse dans le domaine de l'élaboration de ce type de vaccins recombinants. C'est pour cette raison que nous développerons les caractéristiques de cette famille de virus.

Dans un dernier temps, nous détaillerons, par la présentation de plusieurs études publiées, que la méthode de fusion associée à l'expression de la protéine chimère immunogène directement sur la particule virale est une stratégie encourageante pour l'élaboration de vaccins. De nombreuses familles de virus ont déjà été exploitées par ce procédé.

I. Utilisation de vecteurs vaccinaux en médecine vétérinaire : généralités

1.1. Enjeux et intérêts de la vaccination

La vaccination consiste à inoculer à un être vivant tout ou partie d'un agent pathogène afin de provoquer chez celui-ci une immunité spécifique vis-à-vis de cet agent. Elle a également pour but d'induire une mémoire immunitaire à l'origine d'une réponse plus rapide et plus intense que celle observée lors de la primo-infection. Cette réponse immunitaire spécifique est capable de protéger contre l'infection naturelle ou d'en atténuer les conséquences.

1.2. Rappels immunologiques-réponse anti-virale

Les réactions du système immunitaire contre les virus appartiennent à deux catégories : les réponses non spécifiques qui sont similaires pour tous les virus, et les réponses spécifiques qui sont adaptées à chaque virus.

1.2.1. L'immunité non spécifique, première ligne de défense [Baudry et Brezellec, 2006]

Des barrières non immunologiques offertes par la peau et les muqueuses, le pH gastrique... s'opposent à la pénétration virale dans l'organisme.

L'infection débute lorsqu'un virus envahit quelques cellules dans lesquelles il se réplique. Trois systèmes sont alors activés : la réponse inflammatoire, la production d'interférons de type I et le système du complément.

La réponse inflammatoire fait intervenir les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages qui exercent leur rôle de phagocytose. Les interférons (IFN) induisent au sein des cellules un état de résistance anti-virale, par inhibition de la traduction des ARN messagers viraux, ce qui bloque la synthèse des protéines à action cytotoxique. Ces IFN pouvant être libérés par toutes les cellules de l'organisme sont produits de façon autocrine mais également paracrine. L'activation du complément entraîne la lyse des cellules infectées.

Des cellules « natural killer » douées de propriétés cytotoxiques sont capables de détruire des cellules infectées. Leur fonctionnement est amélioré par certaines molécules produites par le système immunitaire spécifique.

Cette immunité non spécifique participe étroitement au développement de la réponse spécifique, notamment par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigène et des cytokines.

1.2.2. L'immunité spécifique

a. Réaction à médiation cellulaire

Elle joue un rôle prépondérant.

Les antigènes viraux dégradés par les cellules présentatrices d'antigène CPA (qui peuvent être des macrophages, des lymphocytes B, des cellules dendritiques) sont présentés :

- aux lymphocytes T CD4+, en association avec une molécule du CMH de classe II,
- aux lymphocytes T CD8+ en association avec une molécule du CMH de classe I.

Dans les deux cas, les lymphocytes reconnaissent le complexe « antigène viral – protéine du CMH » grâce à leur récepteur spécifique du TCR.

La reconnaissance de l'antigène constitue le premier signal d'activation. Ce n'est que lors de la reconnaissance des facteurs de danger grâce aux Toll Like Receptor de la CPA que le second signal d'activation sera fourni par les molécules d'adhésion et par des cytokines.

Les CPA produisent des interleukines 12 (IL-12) qui activent les lymphocytes CD4+ qui se différencient en lymphocytes T helper (LTh). Ces derniers mûrissent selon l'environnement qui les entoure en lymphocytes Th1 ou Th2.

Les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire. Ils produisent deux cytokines majeures : les interférons gamma $IFN\gamma$ associés aux interleukines 2 (IL-2) qui donnent le signal aux lymphocytes T CD8 de devenir des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et activent également les macrophages. D'ailleurs, ce sont ces deux cytokines que nous étudierons par la suite pour évaluer la réponse cellulaire dans notre travail.

Les lymphocytes cytotoxiques envahissent le tissu infecté et provoquent la lyse des cellules infectées.

Les Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale en permettant aux lymphocytes B de se différencier en plasmocytes produisant des immunoglobulines.

b. Réaction à médiation humorale

Elle correspond à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui produisent des anticorps (AC) dirigés contre l'antigène viral qu'ils ont reconnu. Leur multiplication est activée par les lymphocytes T CD4+ qui sécrètent des interleukines (IL-4, 5, 6, 10, 13) comme nous l'avons mentionné précédemment (réponse de type Th2). Il se produit une véritable coopération cellulaire.

Les anticorps se fixent sur les virus circulants et les neutralisent en les agrégeant. Ils favorisent ainsi leur élimination en permettant la phagocytose des « complexes antigènes viraux-anticorps ». Les anticorps, empêchent la pénétration virale dans les cellules en se fixant à leurs protéines de surface nécessaires à leur entrée.

Les anticorps se fixent également aux cellules infectées qui présentent des protéines virales à leur surface, ayant pour conséquence une activation du complément, la lyse de la cellule infectée et sa phagocytose.

Certains anticorps peuvent empêcher la réplication virale grâce à une cascade de signaux intracellulaires. D'autres peuvent se fixer sur le point de sortie du virion, empêchant sa libération par encombrement sérique.

Ainsi, les effecteurs agissent donc à 2 niveaux (*cf. figure 1*):

- au niveau des cellules infectées par le virus
- au niveau des particules virales libres

De nombreuses possibilités de réponse contre les virus existent : synthèse d'IFN de type 1 et blocage de la cellule infectée, phagocytose non spécifique des cellules infectées, destruction des cellules infectées et des virus via le complément, action des lymphocytes T cytotoxiques, synthèse d'anticorps par les plasmocytes permettant une neutralisation virale, une meilleure phagocytose et une lyse cellulaire via le complément.

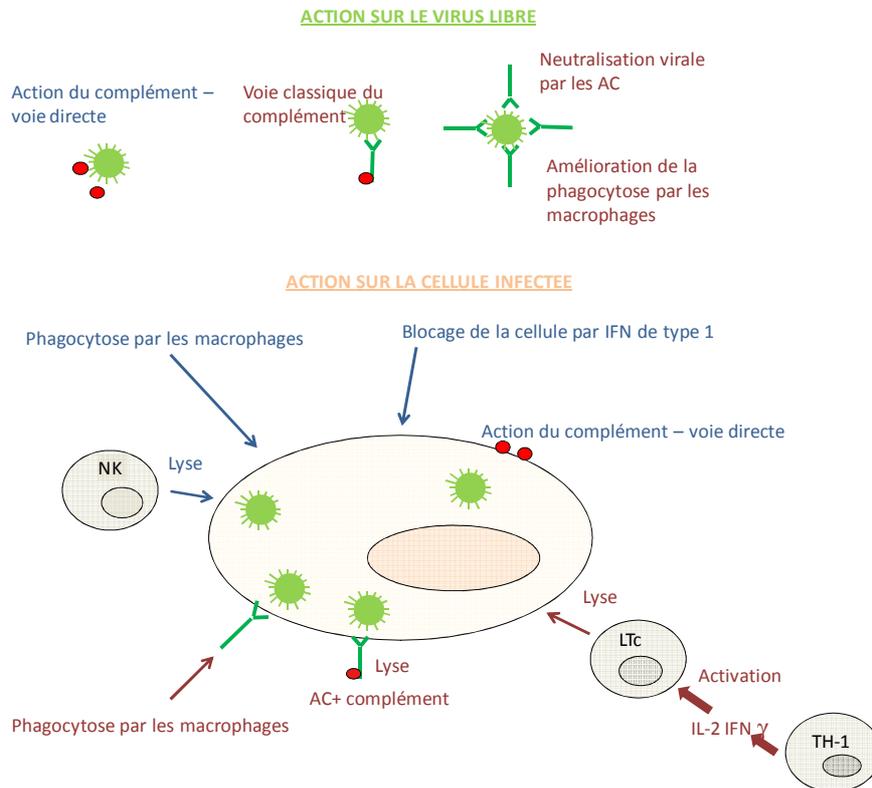


Figure 1: Représentation schématique de la réponse immunitaire antivirale
 Rose : réponse spécifique
 Bleu : réponse non spécifique

1.3. Critères recherchés en vaccinologie vétérinaire [Aynaud, 1991]

Tout vaccin doit être efficace en terme de protection et doit présenter une innocuité à court et long terme. Bien évidemment, il doit également avoir un coût minimum acceptable. Cette contrainte économique est d'autant plus importante dans le domaine des productions animales où le coût unitaire de la dose doit être nécessairement très faible étant donné que les effectifs sont importants et les marges de l'éleveur réduites. Dans la filière de production animale, des contraintes supplémentaires sont présentes. Les protocoles de vaccination doivent être adaptés en réduisant au minimum les interventions pour l'éleveur. Par ailleurs, la présentation et la voie d'administration doivent être adaptées aux conditions d'élevage. D'autres difficultés doivent être prises en compte : la stabilité des vaccins vivants, le respect des normes pour la protection de l'environnement, la nécessité de pouvoir distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés par des tests de routine (stratégie DIVA : Distinction between Infected and Vaccinated Animals). La vaccination s'inscrit également dans un cadre réglementaire propre à chaque pays en fonction du plan de lutte contre le pathogène.

1.4. Différents types de vaccins [Eloit, 1998]

Les vaccins sont classés en deux grandes catégories : les vaccins à agents vivants capables de se multiplier au moins *in vitro* (atténués ou modifiés) et les vaccins à agents inertes incapables de se multiplier (inactivés, sous-unitaires ou peptidiques). On distingue une troisième catégorie de vaccins intermédiaires (*cf. figure 2*).

1.4.1. Vaccins vivants

Les vaccins vivants conventionnels incluent des souches atténuées de l'agent pathogène dont le pouvoir pathogène est faible ou nul pour l'espèce de destination. Ces souches atténuées peuvent être spontanément avirulentes ou sélectionnées par différentes techniques (croissance en milieu sélectif, passages multiples en culture cellulaire, sur espèce animale différente de l'espèce cible,...)

Des vaccins vivants recombinants fabriqués par délétion de gènes de virulence ou par clonage de gène codant des protéines immunogènes dans des vecteurs (viraux ou bactériens) capables de se répliquer appartiennent également à cette catégorie.

L'utilisation d'un vaccin vivant peut présenter des risques : atténuation insuffisante ou retour à la virulence de la souche vaccinale, effets tératogènes, risque de réassortiment génétique avec un virus sauvage, transmission à d'autres animaux (en particulier s'il s'agit d'une maladie vectorielle car le virus circule dans le sang [Albina *et al.*, 2007]). Nous verrons un exemple de problèmes rencontrés suite à la vaccination par des virus vivants en Corse contre la FCO (*cf. paragraphe 2.9.2*).

1.4.2. Vaccins inertes

Les vaccins inactivés conventionnels sont fabriqués par des traitements chimiques ou thermiques. Il est possible de n'utiliser que les fractions immunogènes majeures d'un micro-organisme afin d'élaborer des vaccins sous-unitaires. S'il est difficile ou trop coûteux d'obtenir la protéine immunogène par purification, une alternative consiste à faire exprimer le gène correspondant dans des systèmes *in vitro* (levures, colibacilles, cellules de mammifères...) afin d'obtenir la protéine souhaitée. Enfin, les vaccins fondés sur l'utilisation de peptides de synthèse contenant des épitopes linéaires fabriqués par simple synthèse chimique entrent dans cette catégorie.

1.4.3. Vaccins intermédiaires

On distingue également les vaccins intermédiaires. Cette catégorie regroupe les vaccins recombinants vivants non réplicatifs, obtenus par clonage de gène codant des protéines immunogènes dans des vecteurs non réplicatifs, ainsi que les vaccins à ADN (introduction du gène codant l'antigène vaccinal cloné dans un plasmide d'ADN bactérien).

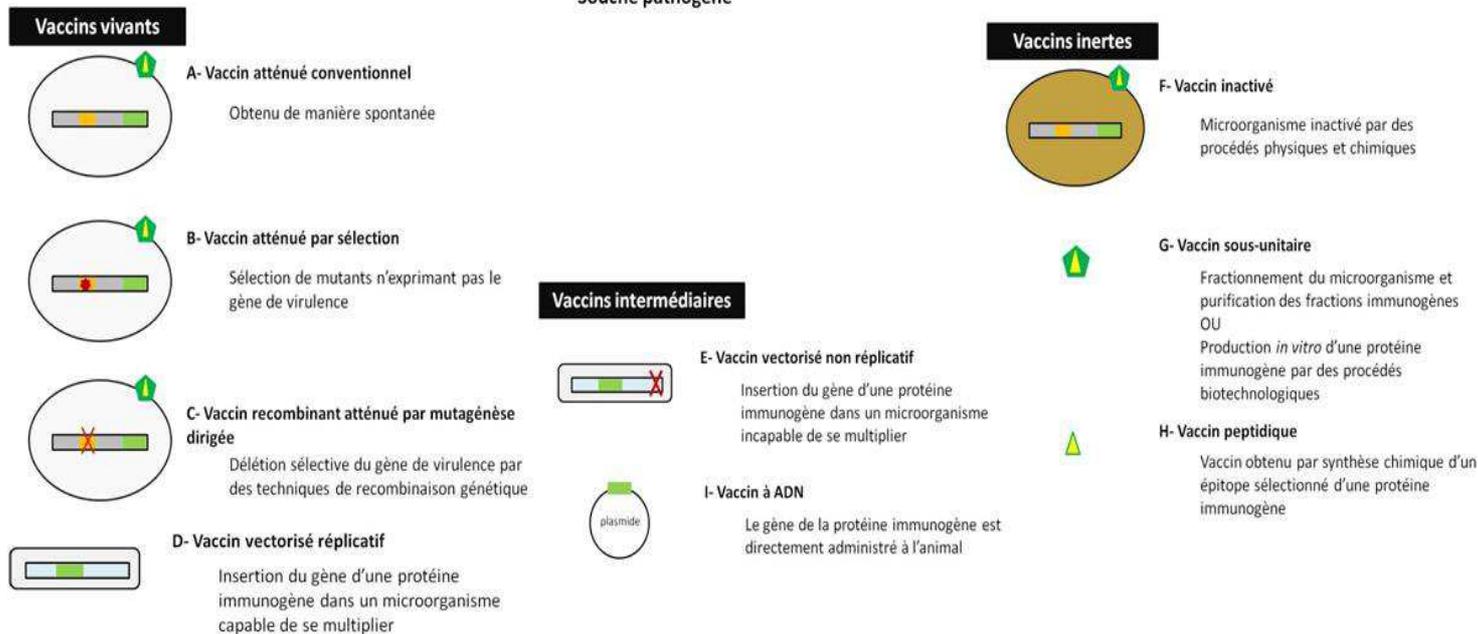
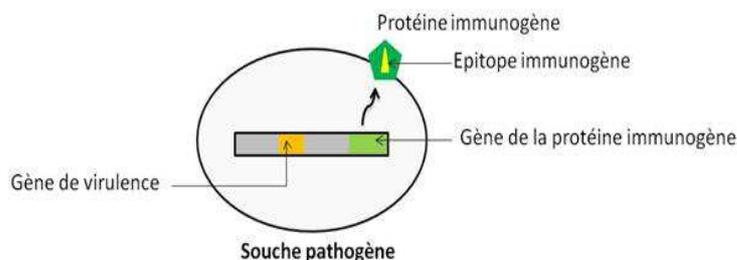


Figure 2: Classification des vaccins conventionnels et recombinants d'après Eloit M., 1998.
Les vaccins recombinants sont les vaccins C, D, E, G dont la protéine est produite *in vitro* et I.

1.5. Intérêts des vaccins recombinants produits par génie génétique [Aynaud, 1991]

Il est possible d'atténuer de manière raisonnée les souches par délétion de gènes de virulence.

Par ailleurs, bien souvent, la réponse immunitaire dirigée contre des protéines majeures suffit à conférer une protection complète. Les vaccins recombinants vectorisés offrent la possibilité de séparer les antigènes susceptibles d'induire une réponse immunitaire du reste des composants du microorganisme pathogène. Seule la partie responsable de l'immunogénicité est conservée, les gènes de virulence sont délétés.

L'atout majeur de ces vaccins recombinants en vaccinologie vétérinaire est de pouvoir distinguer les animaux vaccinés et infectés puisque la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la protéine absente de la souche vaccinale (gène délété) témoigne d'une infection. Ces vaccins s'inscrivent donc dans la stratégie DIVA.

II. La Fièvre Catarrhale Ovine

2.1. Etiologie

La fièvre catarrhale ovine (FCO, *bluetongue* ou BT) est une arbovirose non contagieuse du mouton, transmise par piqûre de diptères hématophages appelés *Culicoides*. L'agent viral responsable est un virus non enveloppé à ARN double brin segmenté du genre *Orbivirus* appartenant à la famille des *Reoviridae*. 24 sérotypes distincts sont connus. Très récemment, deux nouveaux sérotypes ont été découverts : *Toggenburg orbivirus* et BTV-26 du Koweït portant le nombre de sérotypes connus à 26 [Hofmann *et al.*, 2008 ; Chaignat *et al.*, 2009 ; Maan *et al.*, 2011].

Les ovins, caprins, bovins, camélidés et autres ruminants sauvages peuvent être infectés.

2.2. Epidémiologie

2.2.1. Transmission vectorielle

Les ruminants malades et infectés représentent une source virale. La transmission vectorielle est le mode principal d'infection. Le BTV est transmis par la piqûre de diptères hématophages (uniquement la femelle) du genre *Culicoides*, appartenant à la famille des *Ceratopogonidae* (cf. photo 1).

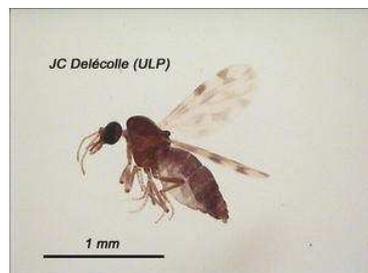


Photo 1: *Culicoides imicola*
(D'après <http://bluetongue.cirad.fr>)

La virémie apparaît rapidement après l'inoculation (environ 5 jours après) et peut persister jusqu'à 30 à 60 jours chez les ruminants [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008].

Seules quelques espèces du genre *Culicoides* sont incriminées dans la transmission du BTV. Le vecteur principal est *Culicoides imicola*. Cependant, il est apparu des foyers de FCO où le vecteur *Culicoides imicola* n'était pas présent. C'est par exemple le cas en Sicile où des épisodes de bluetongue sont apparus en 2002. Dans ce cas, *C. pulicaris* semblaient jouer le rôle de vecteur [Caracappa *et al.*, 2003]. D'autres espèces sont incriminées dans la transmission du virus de la FCO comme *C. milnei* et *C. bolitinos* en Afrique, *C. insignis* en Amérique du Sud, *C. sonorensis* en Amérique du Nord, *C. fulvus*, *C. actoni* et *C. wadai* en région orientale et *C. brevitarsis* et *C. wadai* en Australie [Cirad].

En France, une surveillance entomologique par piégeage de *Culicoides* est mise en œuvre afin de suivre l'évolution des populations de *Culicoides*, de faire l'inventaire des espèces présentes, de suivre leur dynamique de population et de déterminer les dates de début et de fin de leur activité. La figure ci-dessous (cf. figure 3) présente les résultats des captures réalisées en France en 2010. Au total, 3 878 captures ont été réalisées, révélant 66 espèces différentes. *C. imicola* est présent ainsi que d'autres vecteurs potentiels du BTV : *C. obsoletus* et *C. dewulfi*.

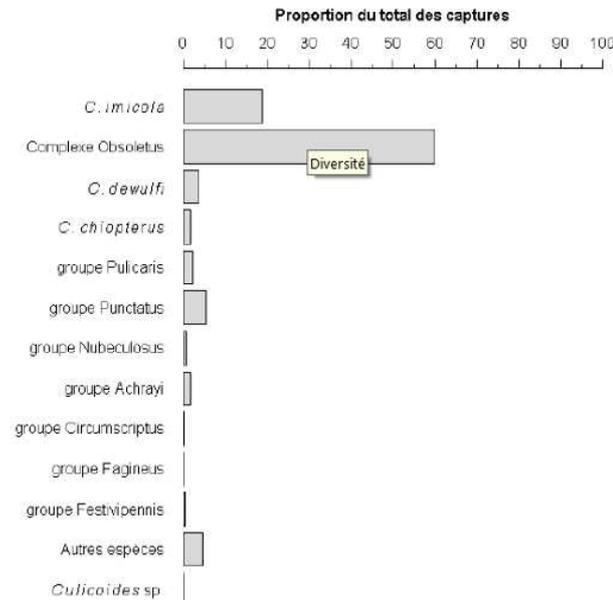


Figure 3: Diversité des *Culicoides* capturés en France métropolitaine (continent et Corse) par le réseau de surveillance entomologique en 2010.
(Journée de restitution 2011-Cirad)

Cette maladie vectorielle a donc une épidémiologie étroitement liée à celle de *Culicoides*. Les *Culicoides* ne sont pas actifs toute l'année. Ils sont en général inactifs au dessous de 13°C et au dessus de 35°C. Ils meurent à -3°C. Même en l'absence du vecteur adulte, le virus persiste en hiver entraînant une recrudescence virale après l'hiver. Ce phénomène appelé « Overwintering » n'est pas entièrement élucidé.

Plusieurs hypothèses ont été émises [Wilson *et al.*, 2008].

Les hypothèses principales sont (cf. figure 4) :

- la persistance de l'infection chez certains ruminants : les lymphocytes $\gamma\delta$ peuvent jouer le rôle de réservoir cellulaire du virus chez les ruminants infectés [Takamatsu *et al.*, 2004].
- la persistance du virus chez quelques *Culicoides* adultes ayant survécu à l'hiver (hiver doux, à l'abri dans les bâtiments). La persistance du virus au sein des vecteurs par passage transovarien et dans les larves a également été évoquée mais le virus entier n'a pas pu être isolé dans les larves [White *et al.*, 2005].
- la transmission transplacentaire chez les ruminants infectés (cf. paragraphe 2.2.2)

D'autres hypothèses qui paraissent plus secondaires sont :

- la transmission horizontale lors de l'accouplement chez les ruminants (cf. paragraphe 2.2.2)
- la persistance chez des animaux réservoirs tels que des élan, des cerfs, la transmission par les tiques...

- la transmission par voie orale (colostrum, consommation de placenta infecté...) (cf. *paragraphe 2.2.2*).

2.2.2. Autres moyens de transmission

Comme il vient de l'être mentionné, des modes de transmission autres que la transmission vectorielle sont évoqués.

La transmission transplacentaire avait déjà été abordée en 1979 par l'équipe de Gibbs qui avait montré que des brebis infectées en milieu de gestation par les sérotypes 4 et 16 avaient donné naissance à des agneaux sans signes cliniques mais dont la virémie persistait 2 mois après la naissance [Gibbs *et al.*, 1979]. D'autres études démontrent ce mode de transmission par infection naturelle que ce soit chez les bovins [De Clercq *et al.*, 2008 ; Zanella *et al.*, 2012] ou chez les brebis [Saegerman *et al.*, 2011]. Cette voie est donc une hypothèse importante prise en compte dans le phénomène d'overwintering.

Il a également été montré expérimentalement que les veaux pouvaient être infectés par voie orale. L'ingestion de colostrum issu de mère non infectée mais contenant du sang contaminé par du BTV (afin de mimer un colostrum infecté sans anticorps maternels comme il se produirait pour une mère infectée tardivement lors de la gestation) a également abouti à l'infection d'un veau [Backx *et al.*, 2009]. Une autre étude plus récente a démontré que le virus pouvait être présent naturellement dans le colostrum et contaminer le nouveau-né [Mayo *et al.*, 2010].

Un autre mode de transmission, plus rare, est la voie vénérienne [Napp *et al.*, 2011]. Le virus est assez résistant, notamment au froid, il est donc bien conservé dans les paillettes utilisées pour l'insémination artificielle, une transmission « iatrogène » par ce mode de reproduction est donc possible et a été démontrée artificiellement. Du virus a été isolé dans les éjaculats de quelques taureaux infectés BTV. Cette semence a servi à inséminer des génisses qui, à leur tour, ont présenté une virémie et une séroconversion pour certaines d'entre elles sans signes cliniques associés. Le virus n'a pas été isolé chez les fœtus issus de cette insémination. [Bowen *et al.*, 1985]. A ce jour, les taureaux et béliers utilisés pour l'insémination artificielle sont testés BTV.

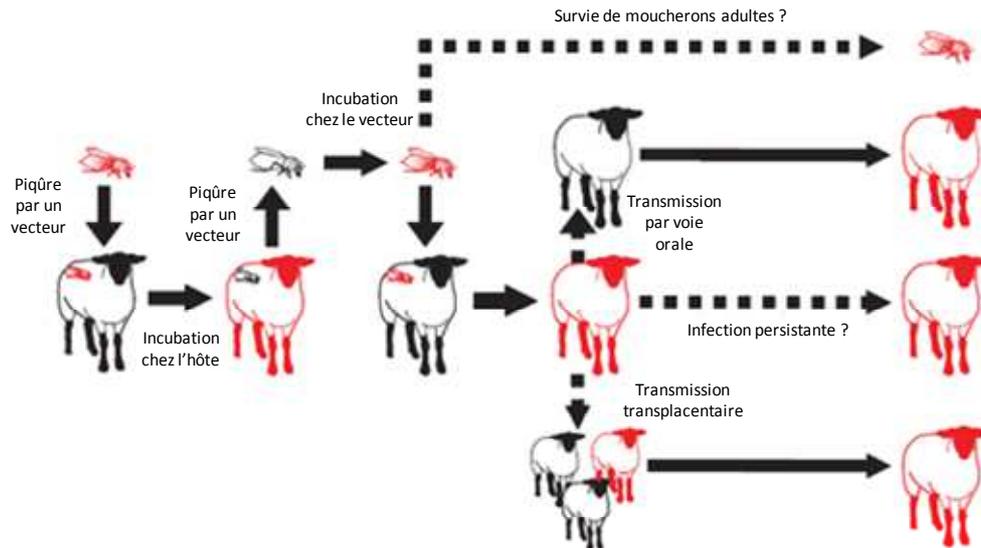
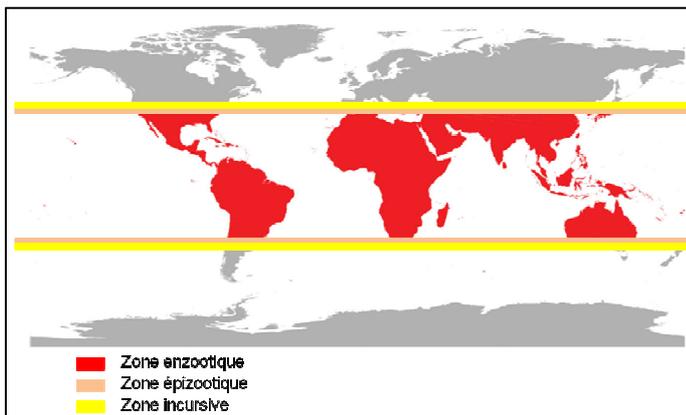


Figure 4: Les différents mécanismes envisageables d'Overwintering.
(D'après Wilson et Mellor, 2009)

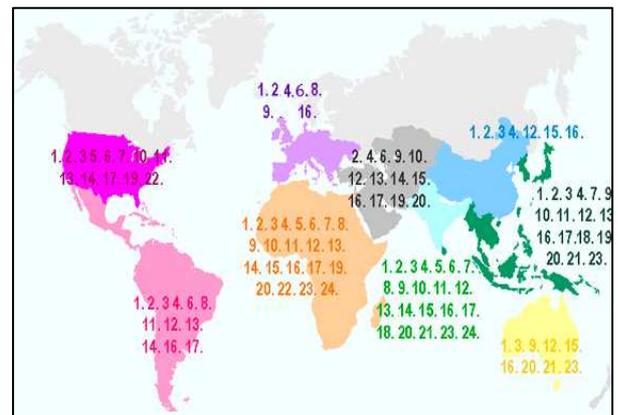
2.2.3. Situation mondiale

On distingue plusieurs zones épidémiologiques dans le monde (cf. cartes 1 et 2) :

- Une zone enzootique où le virus circule de manière constante. Elle contient les 24 sérotypes et concerne les régions tropicales et subtropicales. Les formes cliniques sont moins graves que dans les zones épizootiques ou incursives.
- Une zone épizootique où la maladie apparaît de façon sporadique. Elle entoure les territoires où la maladie est enzootique.
- Une zone incursive où la maladie n'apparaît que de façon accidentelle. Elle est en bordure des zones d'épizootie.



Carte 1: Répartition mondiale de la FCO.
(D'après Wilson et Mellor, 2009 et Agathe Caruso, thèse vétérinaire, 2009)



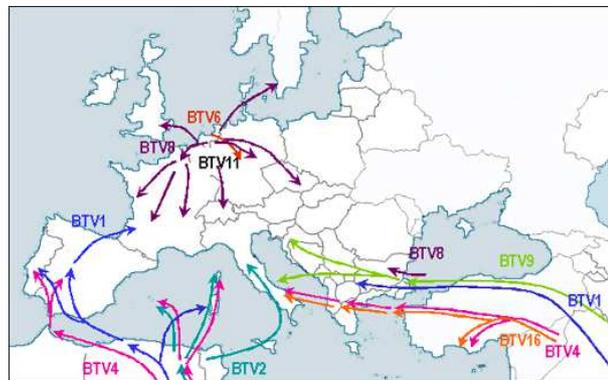
Carte 2: Répartition mondiale des différents sérotypes du virus de la Bluetongue.
(D'après www.fcoinfo.fr)
<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article326>

L'extension géographique peut s'expliquer par :

- le commerce et le déplacement d'animaux virémiques ou de leurs semences.
- le déplacement passif des vecteurs via des vents d'altitude associés à des températures compatibles avec la survie des insectes ou via les moyens de transport
- l'introduction et l'implantation de vecteurs infectés

L'Europe est un point de convergence de différents sérotypes. Plusieurs voies de progression des épizooties sont observées en Europe (*cf. carte 3*) :

- en provenance de l'Est via la Turquie et Chypre,
- à partir du nord de l'Afrique (Algérie, Tunisie) vers l'Italie et les îles méditerranéennes,
- à partir du Maroc vers le sud de l'Espagne et le Portugal,
- par une voie encore inconnue vers le nord de l'Europe...



Carte 3: Voies de progression des épizooties en Europe.

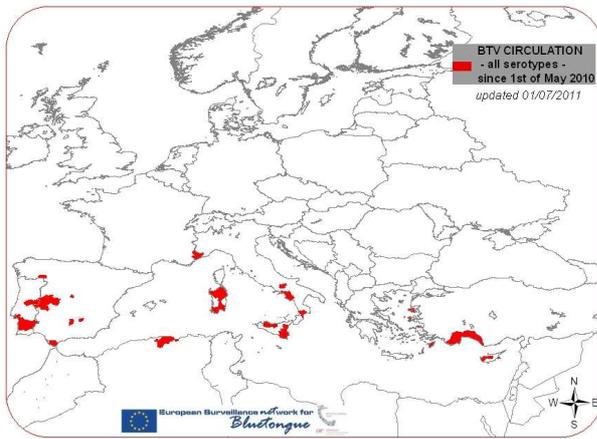
(D'après www.fcoinfo.fr)

<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article326>

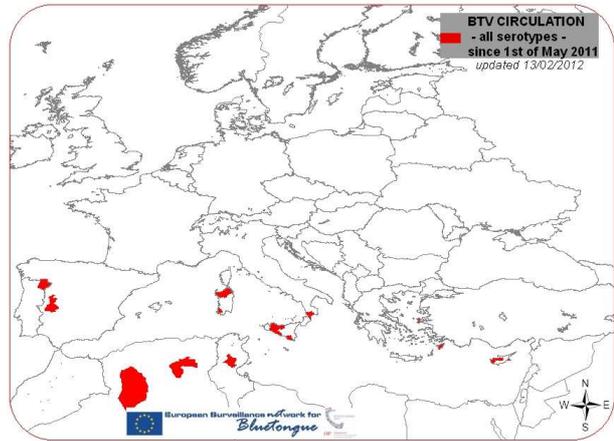
Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1881 en Afrique du Sud. La maladie est présente en France et plus précisément en Corse depuis 2000 avec une première apparition du sérotype 2. Depuis, les sérotypes 4 et 16 y ont circulé.

En août 2006, le BTV sérotype 8 est apparu dans des pays d'Europe du Nord (successivement Pays-Bas, Allemagne, Belgique et Nord-Est de la France), indemnes de la maladie jusqu'alors. En 2007, le sérotype 8 gagne de nouveaux territoires : le Royaume-Uni, le Danemark, la République Tchèque, la Suisse et l'Espagne et s'étend davantage également sur le territoire français.

En 2008, des vaccins inactivés contre les sérotypes 1 et 8 arrivent sur le marché et des campagnes de vaccination massives sont réalisées dans la plupart des pays européens atteints. En 2008, la France demeure durement touchée et la vaccination est rendue obligatoire à partir de l'hiver 2008-2009. Depuis, l'épizootie semble contrôlée en Europe avec peu de circulation entre le 01/05/2010 et le 13/02/2012 (*cf. cartes 4 et 5*). Une des caractéristiques de cette épizootie est la pathologie sévère observée chez les bovins.



Carte 4: Répartition géographique en Europe des régions touchées par le BTV entre le 01/05/2010 et le 01/07/2011.
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/reports/Outbreaks.html>)



Carte 5: Répartition géographique en Europe des régions touchées par le BTV entre le 01/05/2011 et le 13/02/2012.
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/reports/Outbreaks.html>)

2.3. Structure du virus [Albina *et al.*, 2007 ; Caruso Agathe, Thèse vétérinaire, 2009 ; Site internet FCO-Info]

Il s'agit d'un virus de petite taille, d'environ 60 à 80 nm de diamètre.

Le génome viral est constitué de 10 segments d'ARN bicaténaire, chacun codant pour une protéine spécifique. Il est protégé par une capsid protéique à symétrie icosaédrique non enveloppée. Cette dernière est constituée d'une capsid externe et interne. Les protéines qui les composent sont au nombre de 7 : VP1 à VP7.

- *La capsid externe* est composée de deux protéines structurales majeures : VP2 et VP5.

Ce sont les deux seules protéines virales à l'origine de la production d'anticorps neutralisants [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008].

VP2 est une hémagglutinine responsable de l'attachement du virus sur les récepteurs cellulaires. La protéine VP2 est hautement variable, elle est l'antigène spécifique de type et a permis d'identifier 26 sérotypes. Lorsque VP2 est enlevée, l'infectivité et la formation de particules dérivées est très nettement réduite chez les vertébrés.

VP5 modifierait la conformation de VP2 en interagissant avec elle. Les épitopes de VP2 étant dépendants de la conformation, VP5 améliorerait l'immunogénicité grâce à cette interaction [Roy *et al.*, 1990]. VP5 présente une grande variation de taille entre sérotypes. Elle jouerait également un rôle dans le développement d'une immunité cellulaire.

- *La capsid interne (nucléocapsid ou core)* est composée de deux protéines structurales majeures : VP3 et VP7 et de trois protéines structurales mineures : VP1, VP4 et VP6.

a. Les protéines mineures :

Ces trois dernières constituent les complexes de transcription : VP1 est l'ARN-polymérase ARN-dépendante, VP4 est la guanylyltransférase et VP6 est l'hélicase. Ces dernières sont disposées à la face interne de la capsid formée par VP3, au niveau des pores situés aux 12 sommets de la particule à symétrie icosaédrique.

b. Les protéines majeures :

VP3 incorpore et interagit avec les trois protéines mineures du core dont elle permet l'assemblage. Il s'agit de la protéine la plus conservée entre les sérotypes et entre les virus du genre *Orbivirus* (séquence et fonction). Elle possède des déterminants antigéniques spécifiques du groupe.

VP7 est une protéine structurale commune aux différents sérotypes viraux et le diagnostic sérologique de la FCO repose sur la détection d'anticorps dirigés contre cette protéine. Elle serait responsable de la fixation du virus sur les récepteurs présents à la surface des cellules du vecteur et est l'antigène spécifique de groupe du BTV.

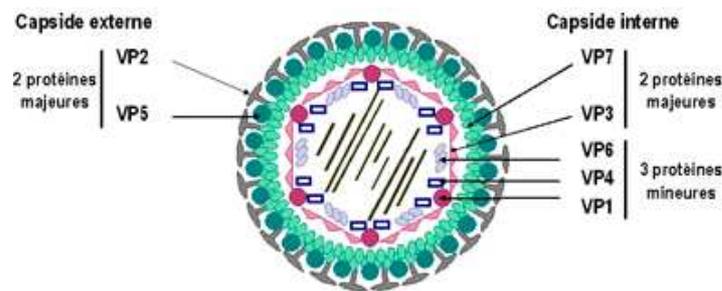


Figure 5: Structure du virus de la Bluetongue.

(D'après www.fcoinfo.fr)

<http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article326>

- Lors de la multiplication du virus, *des protéines non structurales* sont produites : NS1 qui s'accumule dans la cellule et forme des structures tubulaires dans le cytoplasme, NS2 qui est une phosphoprotéine jouant un rôle dans l'organisation du génome avant l'encapsulation et NS3 qui est impliquée dans la libération du virus hors de la cellule infectée.

2.4. Sérotypes et variabilité génétique [Maan *et al.*, 2007]

A ce jour, on distingue 26 sérotypes différents. A l'intérieur d'un même sérotype, il existe une grande variabilité de souches. Des dérives génétiques sont observées (mutations, variations génomiques suite aux passages successifs entre vecteurs et espèces sensibles, réassortiments génétiques entre virus différents en cas de coexistence de plusieurs souches ou sérotypes au sein d'un même cheptel ou de coinfection chez un même animal – ruminant ou vecteur).

Un virus d'un sérotype donné peut induire ou non une protection croisée vis-à-vis d'un virus d'un autre sérotype selon sa proximité antigénique avec celui-ci. Un lien a été établi entre des réactions croisées fortes et l'appartenance à un même nucléotype, défini par le gène codant pour la protéine VP2 inductrice d'anticorps séroneutralisants. A l'intérieur de chaque nucléotype, les séquences du gène L2 codant pour VP2 présentent moins de 35% de différences.

La figure 6 présente la variabilité génétique et la proximité antigénique des 24 sérotypes. Les deux nouveaux sérotypes 25 et 26 découverts récemment et ne figurant pas sur le schéma ci-dessous constituent respectivement les nucléotypes K et L.

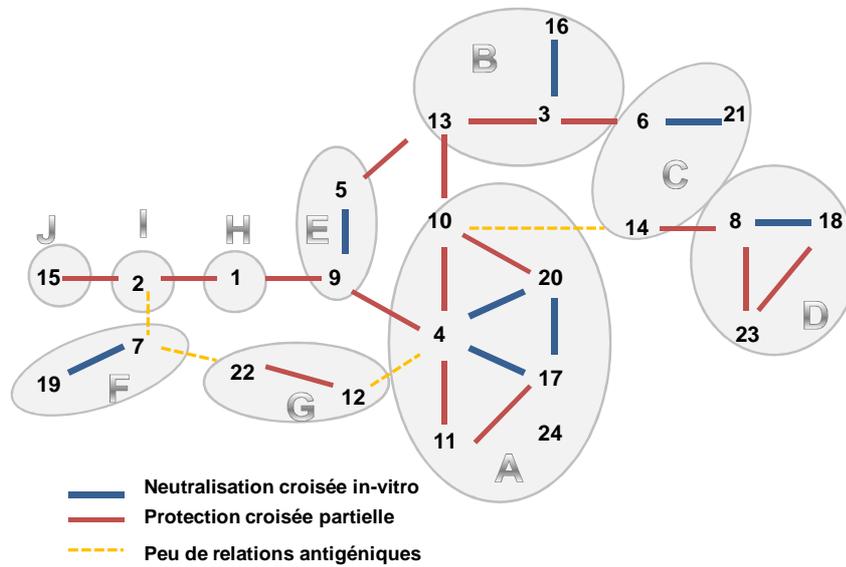


Figure 6: Représentation de la variabilité génétique et la proximité antigénique des différents sérotypes du virus de la Bluetongue.
(D'après Maan et al, 2007)

Concernant les sérotypes 1 et 8 ayant sévi récemment en France métropolitaine, on constate que :

- le virus de sérotype 8 apparaît relativement isolé des autres virus présents en Europe sur le plan antigénique. Il n'a de proximité antigénique importante qu'avec le sérotype 18 appartenant au même nucléotype D.
- le virus de sérotype 1 est seul dans son nucléotype H et ne présente que des réactions croisées faibles avec les virus de sérotypes 2 et 9.

L'immunité croisée entre sérotypes distincts est donc nulle ou au mieux très partielle. Plus deux gènes sont proches, plus la protection croisée sera importante entre ces deux sérotypes. Des vaccins spécifiques pour chaque sérotype doivent donc être utilisés. De plus, la vaccination contre les sérotypes 1 et 8 ne permettra pas de conférer une immunité suffisante vis-à-vis des autres sérotypes.

2.5. Cycle de réplication [Roy, 2001]

Le virus se lie aux récepteurs cellulaires de l'hôte par l'intermédiaire des protéines VP2 à sa surface ce qui déclenche son internalisation. L'acidification de l'endosome induit la fusion de VP5 avec sa membrane, permettant ainsi la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. La réplication du virus a lieu dans le cytoplasme de la cellule, comme tous les *Orbivirus*. La transcription de l'ARN se déroule grâce à l'action de l'ARN polymérase VP1. Les ARNm sont ensuite coiffés par VP4, la guanyltransférase et méthylés. Ces ARNm quittent alors la particule virale par des pores situés aux sommets de la capsidie icosaédrique. Les corps d'inclusion viraux dans le cytoplasme de la cellule infectée sont le lieu d'assemblage des virions. Les dix segments d'ARN double brin y sont synthétisés. Cette synthèse s'effectue simultanément avec la formation des particules provirales. Une fois les particules virales assemblées, les virions sont alors transportés vers la périphérie de la cellule

infectée puis leur sortie s'effectue grâce à NS3, soit par bourgeonnement (surtout chez les insectes) soit par création de pores membranaires (surtout chez les mammifères).

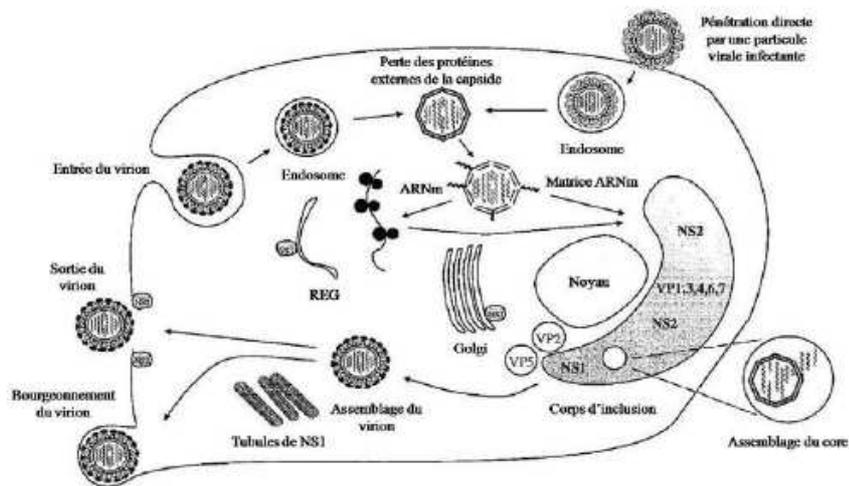


Figure 7: Cycle viral du BTV.
(D'après Roy, 2001 et Caruso Agathe, thèse vétérinaire, 2009)

2.6. Pathogénie et rappels immunologiques [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008]

Après infection par piqûre d'une femelle Culicoïde, le virus se réplique dans le nœud lymphatique adjacent puis diffuse par voie lymphatique et sanguine à l'ensemble des organes et tissus. Il infecte les cellules endothéliales vasculaires, les macrophages et les cellules dendritiques. L'infection des cellules endothéliales entraîne des thromboses vasculaires et des nécroses ischémiques à l'origine du tableau lésionnel (ulcérations buccales, nécrose musculaire, pétéchies...*cf. paragraphe 2.7*). Le virus peut s'associer aux globules rouges ce qui favorise la transmission aux diptères hématophages. Il est ainsi détectable dans le sang des ruminants jusqu'à 6 à 8 semaines après l'infection. L'ARN viral peut être toutefois détecté jusqu'à 160 voire 222 jours post-infection.

De plus, l'infection des lymphocytes $T\gamma\delta$ par le virus permettrait le maintien du virus au niveau de la peau jusqu'à 9 semaines chez le mouton après l'inoculation. La réponse inflammatoire résultant des piqûres ultérieures des Culicoïdes recruterait et activerait ces lymphocytes au niveau de la peau, permettant un cycle viral plus important et favorisant la transmission aux vecteurs.

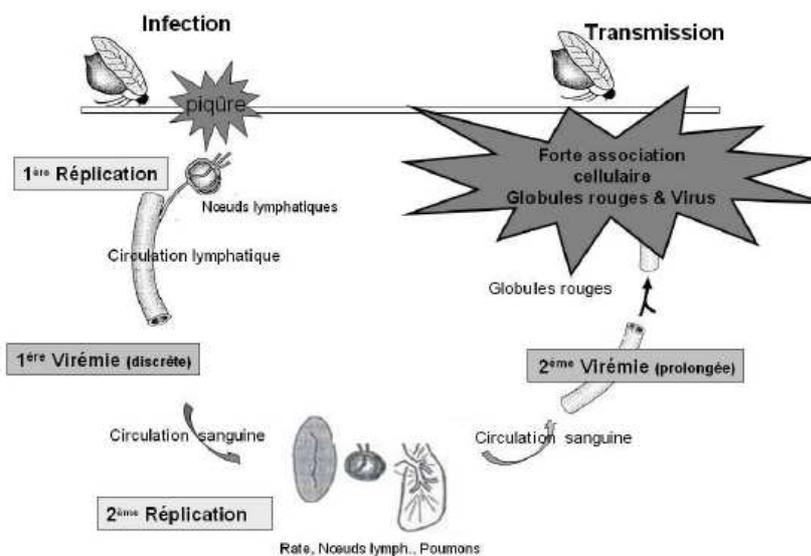


Figure 8: Schéma pathogénique du BTV chez les ruminants.
(D'après Viville Jean-Sébastien, Thèse vétérinaire, 2010)

2.6.1. Pathogénie cellulaire et immunité non spécifique [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008]

Le virus induit une mort cellulaire (apoptose et/ou nécrose), notamment des cellules endothéliales, des monocytes, des lymphocytes $T\gamma\delta$ ainsi qu'un processus inflammatoire. Comme il a déjà été mentionné, le relargage des virions s'effectue surtout par perméabilisation de la membrane des cellules infectées chez les mammifères, ce qui peut expliquer les effets cytopathiques.

L'infection des cellules endothéliales génère la production de cytokines (IL-1,6 et 8), de cyclooxygénase. Ces molécules sont des médiateurs de l'inflammation impliquées dans la pathogénèse de fièvres hémorragiques.

L'infection des ovins et bovins entraîne également une augmentation plasmatique du rapport thromboxane/prostacycline. Le thromboxane est un puissant facteur procoagulant, la prostacycline au contraire, est vasodilatatrice et inhibitrice de l'agrégation plaquettaire. L'augmentation de ce rapport augmente la coagulation et des CIVD peuvent être observées. De plus, ce ratio est significativement augmenté chez les ovins par rapport aux bovins ce qui pourrait expliquer la plus faible expression des signes cliniques chez les bovins.

L'infection par le BTV entraîne également la synthèse d'interférons de type 1. Ceci a été démontré expérimentalement chez des souris, des moutons et des bovins. Les interférons limiteraient la dissémination du virus dans le corps [MacLachlan, 1994] en rendant les cellules infectées et les cellules voisines réfractaires à la multiplication virale (effet paracrine). Les IFN augmenteraient aussi l'induction de la réponse immunitaire spécifique. Ils ne sont plus détectables dans le sang au bout de quelques jours après l'inoculation alors que la virémie persiste.

2.6.2. Immunité spécifique

Des expériences de transfert d'anticorps et de lymphocytes T sur moutons ont permis de démontrer que l'immunité hétérotypique est d'origine cellulaire et implique les cellules LTc, alors que la réponse homotypique est d'origine humorale [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008].

L'idéal serait ainsi d'élaborer un vaccin induisant une réponse humorale et une réponse cytotoxique pour obtenir une protection efficace et de longue durée. C'est pourquoi, dans la partie expérimentale, nous nous sommes intéressés à mettre en évidence une réponse à la fois à médiation humorale et à médiation cellulaire.

a. Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Dès les 6^{ème} - 8^{ème} jours post-infection, un nombre important de lymphocytes T CD8+ est présent dans les nœuds lymphatiques drainant la région d'inoculation. Leur nombre maximal dans le sang est atteint au 14^{ème} jour [MacLachlan, 1994].

Leur participation à la protection a été démontrée par le transfert de LTc spécifiques du BTV à des moutons, ce qui leur a conféré une immunité partielle [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008]. Sur souris, des analyses de la réponse en LTc ont montré que les principales sources de reconnaissance des LTc sont les protéines non structurales, suivies de VP3 puis VP7, VP2 et VP5. Les protéines VP2 et VP5 ne sont pas reconnues par des LTc hétérotypiques.

Chez les ovins, des LTc spécifiques du BTV ont été décrits et la protection qu'ils engendrent est efficace contre des souches homologues et hétérologues. Des essais avec des vaccins recombinants ont montré que les protéines immunogènes pour les LTc sont VP2 et NS1 chez le mouton : les LTc spécifiques de VP2 n'apportent pas de réaction croisée, contrairement aux LTc NS1-spécifiques [Andrew *et al.*, 1995].

*b. Réponse immunitaire à médiation humorale [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008]*

Rappelons que VP2 et VP5 sont les seules protéines virales à l'origine de la production d'anticorps neutralisants.

Des moutons ayant été inoculés avec VP2 ont produit des anticorps neutralisants et étaient résistants face à une épreuve virulente avec le sérotype homologue [Huisman *et al.*, 1987 ; Roy *et al.*, 1990].

La présence de VP2 et VP5 est à l'origine d'une meilleure synthèse d'anticorps neutralisants comparé à la présence seule de VP2 chez les ovins dans un système d'expression baculovirus [Roy *et al.*, 1990 ; Roy *et al.*, 1994]. L'addition d'autres protéines virales (structurales ou non) n'augmente pas cette réponse humorale. VP5 améliorerait la neutralisation du BTV en interagissant avec VP2 et en modifiant sa conformation [Roy *et al.*, 1990].

Cependant, dans une étude de 1997 [Lobato *et al.*, 1997], il n'a pas pu être démontré que l'addition de VP5 à la protéine VP2 dans des vecteurs poxviraux améliorerait chez les ovins la production d'anticorps neutralisants et la protection des moutons contre une inoculation d'épreuve. La protection était meilleure pour le groupe immunisé avec VP2 seule.

De même, la construction d'un vecteur myxomateux SG33 exprimant VP2 seule a conféré une meilleure protection chez des ovins que la construction coexprimant VP2 et VP5, différence pouvant être due à un défaut d'expression de VP2 pour la construction VP2/VP5. [Top *et al.*, 2012].

Des anticorps non neutralisants sont aussi synthétisés contre diverses protéines virales, notamment contre VP7, l'antigène de groupe du BTV, qui servent de marqueur pour les tests de dépistage par ELISA de la FCO [MacLachlan, 1994].

c. Immunité du fœtus

La compétence immunologique vis-à-vis du BTV (ovins et bovins) est acquise dès la moitié de la gestation. Les fœtus peuvent produire des anticorps et des interférons [MacLachlan, 1994]. Ainsi, les conséquences d'une infection d'une femelle gravide diffèrent selon le stade de gestation [MacLachlan et Osburn, 2008].

Si l'infection se produit lors de la première moitié de gestation, des avortements et des malformations congénitales non compatibles avec la vie de l'animal sont constatés.

Si elle a lieu en seconde moitié de gestation, il n'apparaît pas de malformations sévères et les animaux peuvent naître virémiques.

2.7. Symptômes et lésions de la maladie [Site internet FCO-Info]

Classiquement, seuls les ovins présentent des signes cliniques. Les bovins, caprins et autres ruminants sauvages n'expriment que très rarement la maladie. Ce point de vue a évolué depuis l'arrivée du sérotype 8 en Europe du Nord en 2006... En effet, ce sérotype a entraîné d'importants signes cliniques chez les bovins de 2006 à 2009.

L'expression clinique varie selon différents facteurs : l'espèce concernée comme nous venons de l'évoquer, le sérotype en cause et la virulence de la souche, la dose infectante, l'immunité de l'animal...

2.7.1. Chez les ovins

Les manifestations cliniques sont multiples, pouvant varier d'une infection subclinique à aiguë et mortelle.

Habituellement, la virémie est détectable 3 à 5 jours après l'inoculation [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008].

Des signes généraux sont observables : hyperthermie marquée, abattement, tachypnée, anorexie, baisse de la production laitière. Des signes congestifs tels que des oedèmes généralisés (face, cou, scrotum, vulve, mamelle...) et des signes hémorragiques (pétéchies ou hémorragies sur la mamelle, le mufle, les naseaux, la langue) sont rapportés. Des ulcères sur les muqueuses nasales et orales sont également constatés. Enfin, un jetage nasal, une exophtalmie, une conjonctivite bilatérale, du ptyalisme peuvent être constatés. Des raideurs musculaires, des boiteries apparaissent également dues à l'atteinte du bourrelet coronaire (œdème, inflammation).

Des avortements, de la mortinatalité, des naissances prématurées, de l'infertilité provisoire des mâles [Kirschvink *et al.*, 2009] ayant pour conséquence un étalement des mises-bas sont décrits. L'impact naturel de l'infection au sérotype 8 a été étudié sur un troupeau de 300 brebis en Belgique [Saegerman *et al.*, 2011]. Les conséquences de l'infection sur les performances de reproduction d'un troupeau naïf se sont révélées être considérables, s'élevant jusqu'à 25% d'avortements et diminuant le taux de fertilité de 50%.

Des maladies intercurrentes peuvent aussi apparaître.

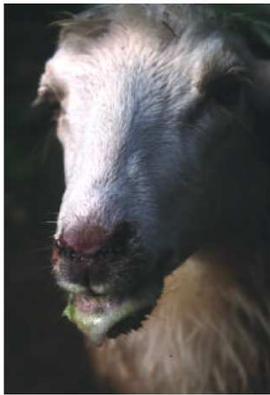


Photo 2: Ptyalisme signant la présence de lésions buccales.

(Photo J.M. Gourreau)

<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/vademecum1.pdf>



Photo 3: Volumineux oedème sous glossien.

(Photo J.M. Gourreau)

<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/vademecum1.pdf>



Photo 4: Ulcère étendu du bourrelet coronaire, pétéchies dans la corne.

(Photo J.M. Gourreau)

<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/vademecum1.pdf>



Photo 5: Congestion du nez, érosions et fissures de la peau, croûtes cicatricielles.

(Photo J.M. Gourreau)

<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/vademecum1.pdf>



Photo 6: Gros ulcère sur la face interne de la lèvre supérieure; hémorragies périphériques.

(Photo J.M. Gourreau)

<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/vademecum1.pdf>

2.7.2. Chez les bovins

Lorsque l'expression de l'infection est clinique, les signes sont similaires à ceux observés chez les ovins.

Les signes généraux constatés sont : une hyperthermie moins marquée que les ovins, de l'abattement, un aspect voussé, des difficultés respiratoires éventuelles, une baisse de la production laitière... Les lésions de la face prédominent : congestion, pétéchies, érosion, jetage nasal, ptyalisme, larmoiement...

Les conséquences sur la reproduction sont variables : avortements, naissances prématurées, mortinatalité, malformations sur les fœtus ou nouveaux-nés (hydrocéphalie, cécité...).



Photo 7: Erythème péri oculaire associé à une congestion des muqueuses.

(D'après Bosquet G., 2007)



Photo 8: Ulcérations du museau.

(D'après Bosquet G., 2007)



Photo 9: Ulcères de la cavité buccale.

(D'après Bosquet G., 2007)



Photo 10: Lésions ulcératives sur les trayons.

(D'après Bosquet G., 2007)

2.7.3. Chez les caprins :

Chez les caprins, l'infection est fugace, le nombre d'animaux présentant des signes cliniques au sein d'un même élevage est très restreint. La mort ne survient que très rarement. On observe surtout des symptômes généraux avec abattement, anorexie, hyperthermie, des atteintes de la face (larmoiement, œdème, ptyalisme, jetage nasal...) et une baisse de la production laitière.

Il est donc aisé de comprendre, au vu des manifestations de la maladie, que les pertes économiques sont très importantes :

- Pertes directes : mortalité, avortements, mortinatalité, infertilité, baisse de la production laitière, déclassement des carcasses, mauvaise qualité de la laine...
- Pertes indirectes : restriction au commerce des animaux, de leur semence ou des embryons

2.7.4. Les lésions :

Les lésions sont, en général, observables uniquement chez les ovins. On retrouve de l'œdème et une hyperémie dans la plupart des tissus (sous-cutanés, tractus digestif, tractus uro-génital, poumons, muscles...). Une congestion et des pétéchies peuvent être observables au niveau du bourrelet et de la couronne de l'onglon. Des hémorragies de la paroi artérielle à

la base de l'artère pulmonaire constituent une lésion considérée comme pathognomonique [Ministère de l'agriculture].

2.8. Diagnostic

2.8.1. Epidémio-clinique

Il repose sur les signes cliniques évoqués précédemment, sur la situation épidémiologique en cours, sur les lésions observées à l'autopsie.

2.8.2. De laboratoire [Albina *et al.*, 2007 ; Sailleau *et al.*, 2011]

Le diagnostic de laboratoire est la plupart du temps indispensable pour confirmer le diagnostic clinique. Il est de plus nécessaire afin d'identifier le sérotype incriminé. Le diagnostic consiste à mettre en évidence le virus ou son génome.

a. Diagnostic virologique

Pour cela, il faut prélever environ 5mL de sang sur tube EDTA pendant la phase de virémie c'est-à-dire pendant la phase d'hyperthermie. Sur cadavre, des fragments de rate, nœuds lymphatiques, cœur peuvent être prélevés.

Après passage sur œufs embryonnés puis en culture cellulaire, le virus pourra être isolé. Le typage s'effectue par neutralisation à l'aide des 24 (26 à présent) sérums hyperimmuns spécifiques de chaque sérotype. Cette technique fournit un résultat en environ 15 jours. Cet isolement est difficile. De plus, il s'avère que l'ARN du virus demeure dans le sang plus longtemps que le virus infectant [Darpel *et al.*, 2007]. Une autre technique plus rapide, de haute spécificité et grande sensibilité est la RT-PCR. Le résultat est obtenu en 24 à 48 heures. La RT-PCR en temps réel permet la quantification du génome.

b. Diagnostic sérologique

Les anticorps sériques sont détectés par diverses méthodes à partir de sang récolté sur tube sec après 15 jours d'évolution symptomatique environ: l'immunodiffusion en gélose et l'Elisa de compétition qui sont deux techniques recommandées par l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale). Ces deux techniques permettent un diagnostic de groupe puisqu'elles reposent sur la détection de VP7. La neutralisation virale sur culture cellulaire est utilisée pour identifier le sérotype en cause ou contre lequel l'animal est immunisé. Cependant, du fait de réactions croisées précédemment évoquées, l'interprétation est délicate.

L'étude de Darpel et ses collaborateurs [Darpel *et al.*, 2007] a montré que le plateau en titre d'anticorps était atteint en 10 jours après infection expérimentale chez les ovins contre 18 jours chez les veaux. La détection avait été réalisée par Elisa de compétition.

A ce jour, aucun test sérologique ne permet de distinguer les animaux vaccinés des infectés.

Diagnostic	Virologique (génomique)		Virologique (virus)	Sérologique	
Types d'analyses	RT-PCR groupe	RT-PCR génotype	Isolement viral sur œufs embryonnés puis culture cellulaire	Elisa	Séro-neutralisation
Période de diagnostic	J+2 à 6 mois		J+3 à 8 semaines	A partir de J+6 à J+10	
Diagnostic de groupe ou de type?	Groupe	Type	Groupe puis sérotypage par neutralisation virale	Groupe	Type
Délai de réponse	24 heures		15 jours à 1 mois	< 2 heures	6 jours

Tableau 1 : Caractéristiques du diagnostic virologique et sérologique.
(D'après Sailleau C. et al, 2011)

2.9. Prophylaxie

2.9.1. Sanitaire

En France, il s'agit d'une maladie réputée contagieuse.

Des mesures sanitaires sont prises selon le statut de la zone.

- En zone non infectée : des mesures de prévention par contrôle des mouvements des animaux, quarantaine, sérologies de contrôle sont mises en place. L'éradication de la maladie est réalisée via des dépistages sérologiques et abattage des animaux séropositifs. Des plans de surveillance entomologique par piégeage sont également organisés.
- En zone infectée : la lutte sanitaire est fondée sur le contrôle du vecteur, l'isolement des animaux. L'abattage des animaux malades et infectés est parfois préconisé.

2.9.2. Médicale : vaccination

La vaccination est le moyen de lutte le plus efficace contre la FCO. Dès l'apparition en Corse en 2000 du sérotype 2, les services vétérinaires ont décidé de la mise en œuvre d'une prophylaxie médicale à l'aide d'un vaccin monovalent à virus atténué. Après deux campagnes de vaccination en 2000 et 2001, ce sérotype n'a plus été isolé. En 2003 et 2004, la Corse a subi de nouvelles épizooties au BTV-4 et BTV-16 et des campagnes similaires ont été menées avec des vaccins atténués. Cette vaccination a dû être arrêtée en décembre 2004 du fait de l'apparition de signes cliniques évocateurs de la maladie chez des ovins suite à cette vaccination. La mauvaise atténuation semblait être en cause. Depuis 2004, les vaccins inactivés sont préconisés.

Avec l'arrivée des sérotypes 1 et 8 en France en 2006, la vaccination a été rendue obligatoire au cours des campagnes de prophylaxie 2008-2009 et 2009-2010. Des vaccins monovalents inactivés étaient alors utilisés. Récemment, un vaccin bivalent contre les sérotypes 1 et 8 est arrivé sur le marché.

- a. *Les vaccins actuels* [Savini *et al.*, 2008 ; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008 ; Niedbalski, 2011]

Les vaccins vivants atténués

Ces vaccins ont l'avantage d'être peu coûteux et ont démontré leur efficacité à plusieurs reprises. Les vaccins atténués produits par Onderstepoort Biological Products en Afrique du Sud ont longtemps été utilisés pour protéger contre le BTV en Afrique du Sud et plus récemment en Corse, Iles Baléares et Italie. Cependant, comme nous venons de le citer, des accidents peuvent survenir si la souche n'est pas assez atténuée. De plus, ces vaccins ne s'inscrivent pas dans la stratégie DIVA. Ces vaccins ont donc été remplacés par des vaccins inactivés. L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) recommande fortement l'utilisation de ces derniers.

Les vaccins inactivés

Ils induisent une immunité protectrice spécifique chez les espèces de ruminants cibles. Par contre, ces vaccins nécessitent plusieurs injections, sont plus coûteux à produire. Ils sont un très bon compromis entre sécurité d'usage et efficacité. Leur efficacité a déjà été démontrée sur le terrain avec leur usage pour les campagnes de vaccination obligatoires en France, ayant conduit à une diminution considérable du nombre de foyers.

Ce sont des vaccins plutôt bien tolérés avec absence de signes induits. Certains ont tout de même été décrits après la vaccination (fièvre, faiblesse, œdème facial, cécité, ptyalisme, avortements, mort...) [González *et al.*, 2010]. Quelques réactions locales ont également été rapportées. Des essais cliniques ont été réalisés afin de vérifier leur innocuité. Ces vaccins induisent de forts titres en anticorps neutralisants, confèrent une protection clinique et ils permettent de réduire voire annuler la virémie (détection par RT-PCR) après épreuve (protection virologique).

Théoriquement, ces vaccins peuvent s'inscrire dans la stratégie DIVA mais actuellement, aucun n'offre pour le moment la possibilité de différencier les animaux vaccinés des infectés. Auparavant, seuls des vaccins monovalents existaient. Il était donc contraignant de suivre les protocoles pour des zones où plusieurs sérotypes existaient. Les animaux devaient recevoir deux injections de primovaccination puis deux autres quelques semaines après ce qui était contraignant. Des vaccins bivalents sont apparus assez récemment sur le marché.

b. Vaccins émergents

- Les Pseudoparticules virales ou VLPs « Virus-like particles »

Ce sont des assemblages de protéines structurales, sans matériel génétique à l'intérieur.

Des VLP formées par combinaison des protéines structurales majeures VP2, VP5, VP7 et VP3 ont été créées. Elles se sont montrées efficaces offrant une protection homologue et

hétérologue partielle dans des essais de laboratoire. Sachant que ces VLP ne contiennent pas de protéines non structurales, elles respectent la stratégie DIVA. L'absence de matériel génétique confère une sécurité d'emploi. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer leur stabilité, leur coût de production et leur efficacité.

- *Les vaccins recombinants*

Comme nous l'avons évoqué précédemment dans la partie I, ils présentent de nombreux intérêts mais il n'est pas si aisé de les réaliser...

Le virus de la vaccine, les canarypox et les capripoxvirus ont déjà été testés :

- trois injections successives de vecteur vaccine exprimant les protéines VP2 ou VP2 associée à VP5 du BTV-1 confère une protection chez des ovins [Lobato *et al.*, 1997]. Cette approche n'a pas été poursuivie.
- un vecteur viral canarypox exprimant VP2 et VP5 du BTV-17 entraîne de forts titres en anticorps neutralisants et confère une protection élevée à l'épreuve virulente chez les ovins [Boone *et al.*, 2007].
- un capripoxvirus exprimant VP2, VP7, NS1 et NS3 du BTV-2 inoculé en une seule injection confère une immunité partielle à des ovins [Perrin *et al.*, 2007].

Comme déjà évoqué précédemment (*cf. paragraphe 2.6.2.b.*), des résultats intéressants ont également été obtenus en utilisant un recombinant poxviral myxomateux SG33 exprimant VP2 qui confère une protection efficace contre une épreuve homologe hypervirulente chez des moutons au BTV-8 [Top *et al.*, 2012].

Quelques études se sont intéressées à la protéine VP7 qui, étant conservée entre les 24 sérotypes, pourrait être à l'origine d'une protection hétérologue. Une étude a indiqué qu'un recombinant capripoxvirus exprimant la protéine VP7 conférerait une protection partielle chez les ovins même s'il n'induisait pas d'anticorps neutralisants [Wade-Evans *et al.*, 1996]. Cependant, des travaux plus récents basés sur la construction d'un poxvirus recombinant exprimant VP7 n'ont pas permis la protection clinique ni la prévention de la virémie chez les ovins (3 injections). De plus, ce recombinant n'induisait pas la synthèse d'anticorps neutralisants [Caruso Agathe, Thèse vétérinaire, 2009].

- *Autres : vaccins à virus « défectueux » ou vaccins « disabled infectious single cycle »*

Ils sont basés sur la production de BTV à qui on a supprimé un ou plusieurs gènes essentiels à sa réplication.

Une fois ces virus « défectueux » inoculés, ils agissent à deux niveaux. Ils sont des immunogènes directs (tout comme les autres vaccins). Ils vont également pénétrer dans les cellules et vont produire uniquement certaines protéines virales sans celles nécessaires à la réplication du virus. Ces vaccins s'inscrivent dans la stratégie DIVA. Seules quelques étapes de cette production de vaccins « défectueux » ont été réalisées pour le moment [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008].

III. Les poxvirus, vecteurs vaccinaux de choix

3.1. Classification

La famille des *Poxviridae* est divisée en deux sous-familles : les *Chordopoxvirinae*, infectant les vertébrés, et les *Entomopoxvirinae*, virus des insectes.

La sous-famille des *Chordopoxvirinae* est elle-même subdivisée en 9 genres. Les membres ont un spectre d'hôte étroit, lié à une espèce cible pour chacun des virus, à l'exception du virus de la vaccine et de quelques autres (*cowpox*, *monkeypox*...). Le virus myxomateux auquel nous nous attacherons plus particulièrement dans ce travail appartient donc au genre *Leporipoxvirus*. Il est à l'origine d'une maladie, la myxomatose, souvent mortelle chez le lapin de garenne ou lapin commun *Oryctolagus cuniculus*, chez lequel il apparaît des lésions cutanées appelées myxomes associées à une immunodépression.

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

Tableau 2: Classification de la famille des *Chordopoxvirinae*.
(D'après King A. et al, 2011)

3.2. Structure

Ces genres ont une morphologie semblable et sont génétiquement et antigéniquement proches. Etant donné que notre travail s'intéressera plus particulièrement au *myxoma virus*, nous l'utiliserons comme modèle pour évoquer la structure de cette famille (cf. figure 9).

Les *Poxviridae* constituent une famille de virus caractérisée par une taille importante des particules virales (220 à 450nm de long, 140 à 260nm de largeur et d'épaisseur), du génome (de 135 à 375 kb) ainsi qu'un cycle viral entièrement cytoplasmique [King et al., 2011].

Le virus de la myxomatose est un gros virus d'environ 300x250x200 nm³ à symétrie sphérique. Il possède un core en forme d'altère qui contient le génome. Des corps latéraux

amorphes sont observables, leur rôle et leur origine sont inconnus. Ces virus sont entourés d'une ou deux enveloppes selon la forme infectieuse. Deux formes infectieuses principales sont décrites : les formes intracellulaires matures IMV et les formes extracellulaires enveloppées EEV. Les formes IMV sont produites en plus grande quantité que les formes EEV [Moss, 2001]. Ces dernières possèdent une membrane externe supplémentaire, et sont issues d'une petite fraction des IMV ayant acquis une double enveloppe dérivée du Golgi ou des endosomes pour aboutir à des formes IEV (Virus intracellulaire enveloppé) à l'origine des CEV (Virus enveloppés associés aux cellules) et des EEV.

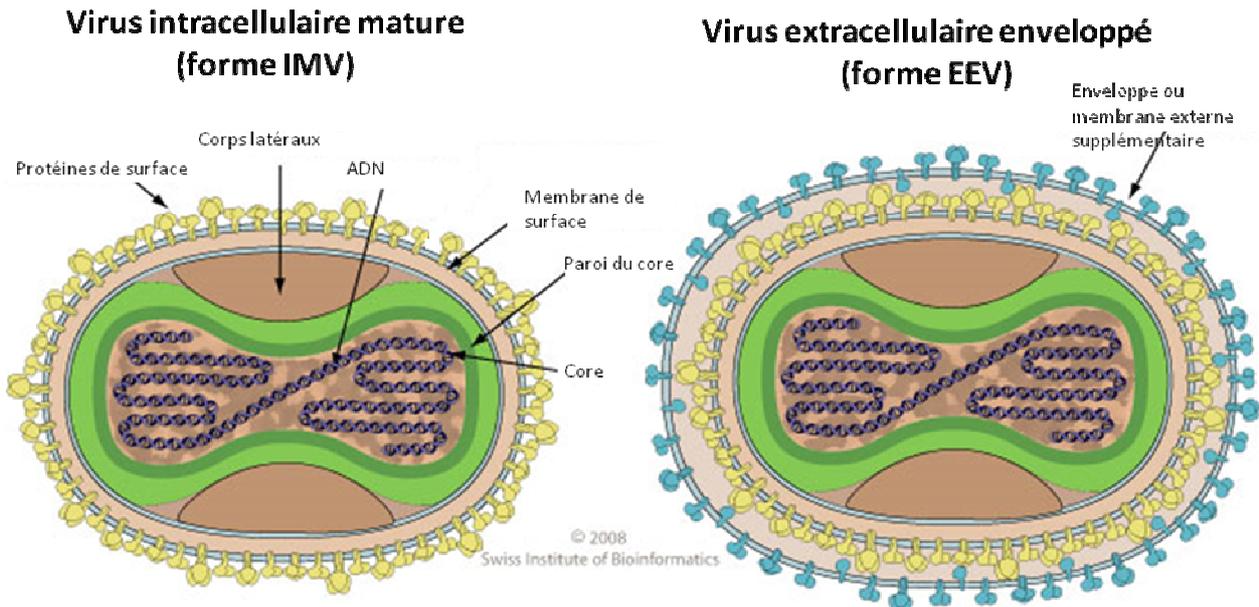


Figure 9: Structure générale des Leporipoxvirus.
(D'après Swiss Institute of Bioinformatics, 2008)
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/153.html

3.3. Génome

L'organisation générale du génome est la même pour tous les *Poxviridae* (cf. figure 10).

Il s'agit d'une molécule d'ADN bicaténaire, linéaire, entre 135 et 375 kb, qui se termine en épingle à cheveux à chacune de ses extrémités. On y distingue, en région centrale, les gènes essentiels pour le cycle viral. Ils y sont présents en un seul exemplaire. Aux régions terminales, on y distingue des gènes répétés (régions terminales répétées inversées RIT) codant essentiellement pour des facteurs de pathogénicité.

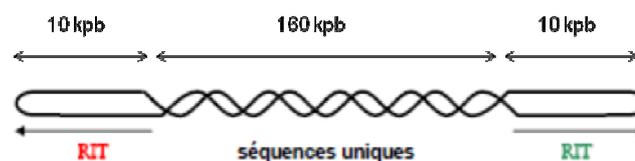


Figure 10: Représentation schématique du génome des Poxvirus. Exemple du virus de la Vaccine.

RIT : Répétitions inversées terminales.

Le génome de la souche SG33 du virus myxomateux utilisée dans la construction des recombinants ayant servi dans ce travail est constitué de 148,244 kb. Seules 1,045bp de la séquence droite RIT demeurent dans la séquence SG33. Cette délétion entraîne la disparition de plusieurs gènes codant pour des facteurs de pathogénicité (gènes M152R, M153R, M154R, M156R...) conduisant à une plus grande atténuation de la souche.

Cette souche a été obtenue en 1977 par plusieurs passages sur cellules rénales de lapin ou sur cellules d'embryons de poulet à 33°C à partir d'un isolat obtenu d'un lapin sauvage mort dans les alentours de Toulouse en 1973 [Camus-Bouclainville *et al.*, 2011].

3.4. Cycle viral

Ce cycle dure entre 12 et 24 heures environ.

3.4.1. Entrée du virus dans la cellule

L'entrée de la forme IMV se ferait par fusion avec la membrane plasmique, faisant intervenir des interactions peu spécifiques et spécifiques [Carter *et al.*, 2005]. L'entrée des formes EEV est plus problématique mais il semblerait, pour le virus myxomateux, qu'il y ait parfois une rupture préalable de l'enveloppe et entrée en forme IMV. Les hypothèses d'endocytose et/ou phagocytose/ macropinocytose sont également conservées [Duteyrat *et al.*, 2006].

3.4.2. Expression des gènes viraux

L'expression des gènes est séquentielle. On distingue ainsi les gènes précoces, transcrits avant la réplication du génome viral, des gènes intermédiaires et des gènes tardifs. Les gènes précoces sont transcrits par l'ARN-polymérase ADN-dépendant virale, associée à des facteurs empaquetés dans le core viral. Ces gènes codent pour des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN et à la transcription intermédiaire ainsi que pour des protéines à diverses fonctions impliquées dans les interactions avec la cellule hôte [Moss, 1996]. Il se produit alors la réplication de l'ADN et l'expression des gènes intermédiaires et tardifs. Ceci aboutit à la morphogénèse de virions.

3.4.3. Assemblage – maturation – libération des virions

L'assemblage des virions a lieu dans les virosomes (identifiables en microscopie électronique) où ils deviennent matures, donnant des IMV. Les IMV produits sont soit libérés lors de la lyse cellulaire, soit couverts d'une double enveloppe par le Golgi ou des endosomes (forme IEV) puis sont libérés par fusion avec la membrane plasmique donnant des CEV/EEV.

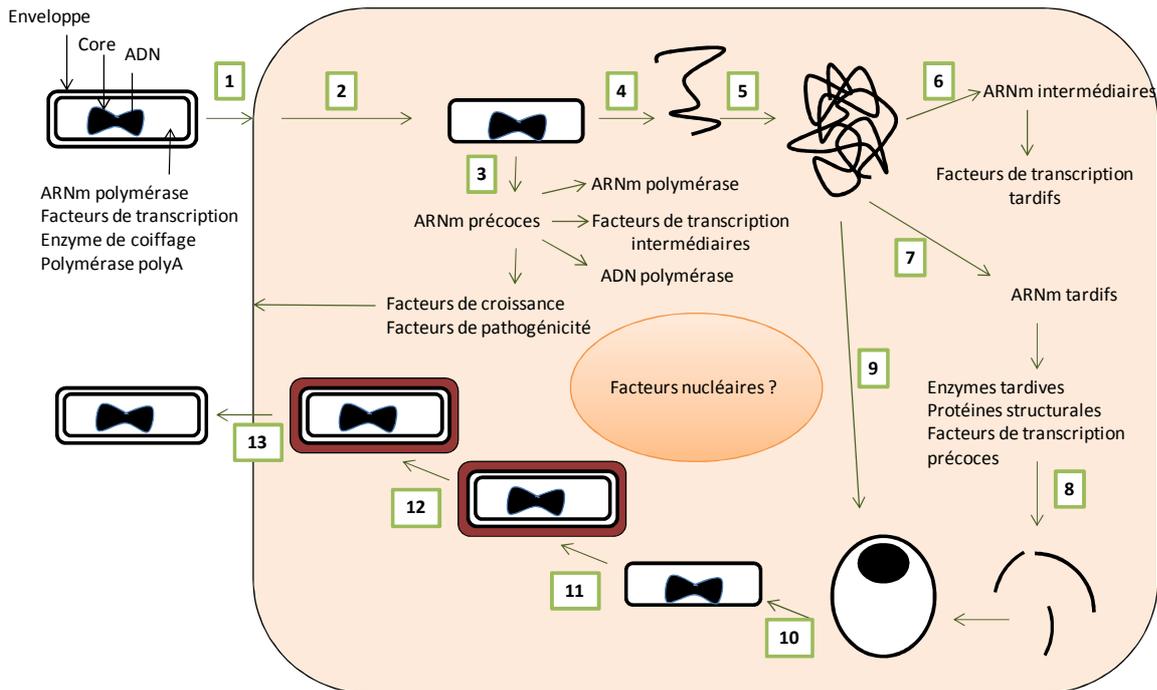


Figure 11: Le cycle de répliation des Poxvirus.
(D'après Moss, 2001)

- 1 : attachement à la cellule
- 2 : pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme
- 3 : transcription des gènes précoces
- 4 : déshabillage du core
- 5 : répliation de l'ADN et formation de concatémères
- 6 : transcription des gènes intermédiaires
- 7 : transcription des gènes tardifs
- 8 : début de l'assemblage avec les premiers fragments de membrane
- 9 : résolution des concatémères et incorporation d'ADN
- 10 : maturation et formation des IMV
- 11 : acquisition d'une double enveloppe (IEV)
- 12 : migration vers la surface cellulaire à l'aide du cytosquelette
- 13 : fusion avec la membrane cellulaire et formation des virus enveloppés associés à la cellule (CEV) et libération d'EEV

3.5. Utilisation des poxvirus en tant que vecteurs recombinants

Le virus de la vaccine est le premier à avoir été envisagé comme vecteur vaccinal dans les années 80. Il demeure un vecteur très étudié à ce jour. Il a été montré que l'insertion et l'expression de gènes au sein du génome du virus de la vaccine étaient possibles, induisant une réponse immunitaire contre les gènes insérés [Drillien *et al.*, 2003]. Depuis, de nombreux autres poxvirus sont à présent utilisés en tant que vecteur...

3.5.1. Intérêts/Atouts [Messud-Petit et Bertagnoli, 2000]

L'utilisation des poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux présente de nombreux avantages.

Tout d'abord, leur cycle de réplication est strictement cytoplasmique, réduisant les complications pouvant être liées à l'insertion d'ADN dans le génome des cellules hôtes. L'insertion de grandes quantités d'ADN étranger (plus de 25kb) dans leur génome est tolérée, ainsi que la délétion de gènes non essentiels. Etant donné que les poxvirus possèdent leur propre matériel nécessaire à la transcription, un gène mis sous la dépendance d'un promoteur poxviral sera transcrit au cours du cycle infectieux. Les modifications post-traductionnelles de la protéine recombinée sont très proches de celles de la protéine native, son activité est en général parfaitement conservée.

Concernant les paramètres à prendre en compte pour toute production de vaccins, le coût de production est faible. De plus, étant donné qu'il s'agit de vaccins vivants, la dose protectrice minimale est réduite. Les poxvirus sont également assez stables, ils supportent la congélation, la lyophilisation et la réhydratation sans perte importante du pouvoir infectieux. De plus, ils sont faciles à administrer : par voie intradermique ou par voie orale pour certains.

Enfin, ces vaccins recombinants sont intégrés dans la stratégie DIVA en vaccination vétérinaire.

3.5.2. Limites [Messud-Petit et Bertagnoli, 2000]

Les poxvirus utilisés pour la vaccination sont des virus vivants, ils détruisent à terme les cellules qu'ils infectent.

Cependant, le problème majeur demeure la pathogénicité résiduelle. Les facteurs de pathogénicité doivent donc être parfaitement maîtrisés et des souches totalement apathogènes ou des poxvirus à spectre d'hôte étroit doivent être préférentiellement utilisés.

De plus, il existe des similitudes antigéniques entre différents virus de la famille des poxvirus, ce qui peut poser problème si une immunité vis-à-vis du vecteur préexiste.

Compte tenu des nombreux avantages que cette famille présente en tant que vecteurs vaccinaux, l'utilisation des poxvirus se poursuit dans de nombreuses études.

3.5.3. Quelques exemples en médecine vétérinaire

a. Les Orthopoxvirus

Le virus de la vaccine est le premier vecteur poxviral vaccinal à avoir été utilisé. Par exemple, il a été utilisé dans la lutte contre la rage en Europe. L'utilisation du VACV exprimant la glycoprotéine G, un antigène de surface du virus rabique, a permis la vaccination orale des renards d'Europe (Raboral® de Merial).

De même, nous avons déjà vu que ce vecteur a été utilisé par exemple pour la recherche contre la FCO [Lobato *et al.*, 1997].

b. Les Avipoxvirus

Ces vecteurs, dont les oiseaux sont les espèces cibles, ont montré leur efficacité chez ces espèces (vaccins contre Newcastle disease, la laryngotrachéite infectieuse chez les

poulets... commercialisés par Biomune aux Etats-Unis sous le nom de gamme Vectormune ® (FP) ainsi que chez les mammifères.

Un *Canarypox* recombinant exprimant des protéines du virus de la leucose féline est actuellement sur le marché pour la vaccination des chats (Purevax FeLV ®). Ces vecteurs sont également utilisés pour vacciner les chevaux contre la grippe équine (ProteqFlu ®). D'autres vaccins vétérinaires déjà commercialisés aux Etats-Unis par Merial sont basés sur le vecteur *Canarypox* (contre la rage du chat : Purevax Feline Rabies®, contre la maladie de Carré de la gamme Recombitek ®).

Comme nous l'avons précédemment évoqué, un vecteur viral canarypox exprimant VP2 et VP5 du BTV-17 a été élaboré par l'équipe de Boone [Boone *et al.*, 2007].

c. *Les Capripoxvirus*

De nombreuses études ont porté sur les *Capripoxvirus* en tant que recombinants dans le but d'élaborer des vaccins contre la peste des petits ruminants, la Fièvre de la vallée du Rift, maladies largement présentes en Afrique [Brun *et al.*, 2008].

Ils sont également utilisés dans la recherche contre la FCO comme nous l'avons déjà fait remarquer [Wade-Evans *et al.*, 1996 ; Perrin *et al.*, 2007].

3.5.4. Le *Myxoma virus* : un poxvirus vecteur prometteur

Le virus myxomateux a tout d'abord été envisagé comme vecteur chez l'hôte naturel. La vaccination des lapins avec un virus myxomateux SG33 vivant exprimant la protéine de capsid VP60 du virus de la maladie hémorragique du lapin (MHD) offre une double protection par une seule injection par voie intradermique [Bertagnoli *et al.*, 1996].

Ce vecteur est également utilisé chez d'autres espèces. Un essai concluant de vaccination a été réalisé chez le chat contre la calicivirose féline en utilisant un virus myxomateux atténué exprimant la protéine de capsid du virus de la calicivirose féline [McCabe *et al.*, 2002].

L'équipe de l'UMR 1225 INRA-ENVIT Interactions Hôtes-Virus en Vaccinologie (IHVV) s'intéresse depuis plusieurs années à l'utilisation de vecteurs *Myxoma virus* chez les ruminants.

L'infection de moutons par un recombinant SG33 exprimant la protéine VP60 du virus de la maladie hémorragique du lapin a entraîné la production d'anticorps contre la VP60 et contre le vecteur [Pignolet *et al.*, 2008]. Cinq recombinants ont alors été construits, exprimant diverses protéines du BTV-2 (SG33-VP7, SG33-VP2, SG33-NS1, SG33-NS2 et SG33-NS3) et furent injectés à des moutons. L'expression des protéines VP2 et NS3 n'avait pas pu être démontrée à l'époque faute de moyens. Cependant, une réponse importante en anticorps anti-VP7 avait pu être mise en évidence mais aucune protection clinique n'avait été obtenue après épreuve de virulence homologue [Pignolet Béatrice, Thèse de doctorat, 2007]. Cette étude a été poursuivie, ce recombinant SG33-VP7 a de nouveau été utilisé pour immuniser des moutons avec un protocole plus lourd de 3 injections, et une épreuve hétérologue avec le

BTV-8 a été réalisée. Une forte réponse humorale en anticorps anti-VP7 ainsi que l'induction d'une réponse cellulaire CD4+ a été mise en évidence. Cependant, aucune réponse en anticorps neutralisants n'a été mise en évidence. Aucune protection homologue ou hétérologue n'était conférée [Caruso Agathe, Thèse vétérinaire, 2009]. Ces études ont alors été poursuivies avec les antigènes VP2 et VP5. Il a été montré qu'un vecteur recombinant SG33-VP2 entraînait la formation d'anticorps neutralisants et une bonne protection clinique chez les moutons [Top *et al.*, 2012].

Tous ces travaux démontrent que le virus myxomateux est un vecteur prometteur. Classiquement, les gènes y sont insérés dans des zones intergéniques ou dans des zones contenant un ou des gènes non essentiels à la réplication virale (TK, MGF, M11L...). Il existe une nouvelle approche plus récente consistant à faire exprimer au vecteur la protéine chimère directement sur sa surface. Cette technique a été utilisée en vue d'améliorer le vecteur myxomateux par l'UMR 1225 (comme évoqué en introduction) et est utilisée dans ce travail. C'est donc l'occasion de faire un état des lieux actuel sur l'utilisation de cette technique dans le monde de la recherche.

IV. Etat des lieux actuel sur l'utilisation en recherche de la stratégie de fusion avec expression de la protéine d'intérêt sur l'enveloppe de la particule virale

La majorité des vaccins fondés sur des vecteurs poxviraux produisent des antigènes cytoplasmiques, qui sont excrétés ou exprimés à la surface des cellules infectées. La technique de fusion de protéines permettant l'expression de l'antigène directement sur la particule virale apparaît prometteuse et est utilisée dans diverses études en vaccinologie. Le but est d'obtenir des virions chimères hautement immunogènes. Cette méthode ne doit bien évidemment pas altérer la pénétration des virions dans les cellules hôtes ainsi que leur production.

A ce jour, très peu d'études utilisant cette technique et fondées sur l'utilisation des poxvirus ont été publiées. Actuellement, des chercheurs travaillant sur des maladies mortelles de l'homme telles que le sida, le virus Ebola, la peste, l'anthrax... se tournent vers cette technique afin de tenter d'élaborer des vaccins efficaces.

4.1. Utilisation des poxvirus en tant que vecteur chimère

4.1.1. Antigène du HIV- Human immunodeficiency virus

Cette technique a notamment été utilisée dans le domaine de la recherche contre le sida.

Les souches atténuées IHD et WR du virus de la vaccine ont été utilisées dans un premier temps. Initialement, il a été démontré qu'il était possible d'adresser une glycoprotéine chimère du virus du HIV type 1 dans l'enveloppe externe de la forme EEV en créant des recombinants.

Pour cela, des recombinants portant un gène chimère codant pour le domaine extracellulaire de la protéine d'enveloppe du HIV type 1, fusionné avec les domaines cytoplasmique et transmembranaire de la protéine B5R du virus de la vaccine ont été élaborés. Il a été prouvé que des signaux responsables de l'adressage vers l'enveloppe de la forme EEV existent dans les domaines cytoplasmiques et transmembranaires de la protéine B5R et que, de plus, ces domaines sont suffisants pour l'adressage. Cette protéine B5R est donc très intéressante.

Ainsi, les virus chimères portent sur leur enveloppe externe une protéine chimère composée du domaine extracellulaire de la protéine d'enveloppe du HIV et des domaines cytoplasmique et transmembranaire de B5R [Katz *et al.*, 1997].

De plus, l'immunogénicité de ces protéines fusionnées dépend de leur construction. En effet, la protéine fusionnée contenant le domaine extracellulaire de la protéine d'enveloppe du HIV entraîne un taux plus élevé d'anticorps spécifiques au HIV que la protéine fusionnée avec l'intégralité de la glycoprotéine d'enveloppe chez des lapins et souris [Katz et Moss, 1997].

Ces études ont été poursuivies en utilisant la souche Ankara (MVA) [Barchichat et Katz, 2002], souche hautement atténuée du virus de la vaccine après 585 passages sur culture de fibroblastes d'embryon de poulets, et présentant moins de risque à l'usage que la souche WR. Le recombinant MVA/B5R a été élaboré sur le même schéma de construction que précédemment. Ce virus chimère exprime cette protéine fusionnée dans les cellules infectées testées : fibroblastes d'embryon de poulet ainsi que dans des cellules Vero rénales du singe vert d'Afrique BS C 1 (mais expression plus faible dans ces dernières). Des lapins ont été immunisés par ce recombinant MVA/B5R et il a été démontré que ce recombinant induit des titres élevés en anticorps contre la protéine d'enveloppe du HIV chez le lapin en plus d'anticorps neutralisants contre le poxvirus.

Cependant, ces études n'ont pas porté sur la réponse cellulaire.

Une étude plus récente de 2004 démontre que la réponse cellulaire chez des souris est également augmentée lorsque l'antigène est présent directement dans l'enveloppe des formes EEV comparé à un recombinant n'intégrant pas l'antigène dans l'enveloppe des EEV [Kwak *et al.*, 2004]. Pour cela, un recombinant utilisant la souche IHD du virus de la vaccine et remplaçant la partie cytoplasmique de la protéine B5R par la séquence HIV- Gag a été créé. Il a été démontré au préalable que les formes EEV sont formées même en l'absence de la partie cytoplasmique de B5R.

4.1.2. Antigène du virus Ebola

Une équipe de chercheurs de l'Unité de virologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées de La Tronche (France) en partenariat avec l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire /Inserm U964 à Illkirch (France) utilise également cette technique de fusion avec une protéine virale dans le domaine de la lutte contre le virus Ebola, virus appartenant à la famille des *Filoviridae*, responsable de fièvres hémorragiques sévères mortelles chez l'homme. Pour l'instant, aucune publication n'y est associée (Journées francophones de virologie à Paris 2010). La seule protéine présente à la surface du virus Ebola est la glycoprotéine GP et celle-ci semble être une cible idéale pour le système immunitaire. Par conséquent, le gène de cette protéine est utilisé dans le cas présent. Il est

fusionné avec les domaines transmembranaire et intracellulaire de la protéine B5R de la souche *Lister* du virus de la vaccine. Actuellement, il a été montré que cette protéine est bien exprimée par le vecteur. Les étapes de sélection des vecteurs sont en cours [Dimier *et al.*, 2010].

4.1.3. Antigène de *Yersinia pestis* (Peste) [Embry *et al.*, 2011]

Historiquement, cette maladie a été responsable de pandémies tuant de 50 à 100 millions de personnes dans le monde. Elle entraîne une forme pulmonaire ou bubonique principalement. Actuellement, aucun vaccin n'est réellement efficace. Le seul commercialisé dans certains pays mais à usage restreint est basé sur la réponse humorale. Cependant, il est apparu que la réponse cellulaire contribue également à la protection et il a donc paru nécessaire d'élaborer de nouveaux vaccins. Ce d'autant plus que *Yersinia pestis* représente une menace bioterroriste.

Dans le cas présent, la souche ACAM2000 du virus de la vaccine a été utilisée de sorte qu'elle exprime l'antigène LcrV, fusionné à sa partie C-terminale avec le domaine transmembranaire de la protéine D8 du VACV, cible majeure d'anticorps. L'originalité de cette méthode par rapport aux précédentes réside dans le fait que la protéine chimère soit exprimée à la surface des formes IMV et non pas EEV. Seule une petite fraction des virions produits après infection est sous forme EEV. Ainsi il apparaît plus intéressant et efficace de placer l'antigène sur le plus grand nombre de virions, donc en l'occurrence sur les formes IMV. Dans cette étude, il s'est révélé que le recombinant décrit précédemment induit une réponse immunitaire humorale plus efficace que les autres recombinants n'exprimant pas l'antigène sur la particule virale. De plus, les deux autres recombinants confèrent une protection plus faible aux souris inoculées. La protection est évaluée par le pourcentage de survie. Dans ce cas, une seule injection du virus chimère confère une bonne protection.

4.1.4. Antigène du virus Influenza aviaire et GFP (Green Fluorescent Protein)

L'équipe UMR 1225 INRA-ENVT a élaboré des recombinants exprimant des protéines de fusion avec la GFP ou l'ectodomaine de la protéine M2 (M2e) du virus Influenza aviaire.

L'ectodomaine M2e a été fusionné par sa partie amino-terminale avec M022L ou par sa partie carboxy-terminale avec M071L du virus myxomateux souche Toulouse 1 (recombinants T1-N-M2e-M022L et T1-C-M2e-M071L). De la même façon, le recombinant T1-N-Gfp-M022L a été créé à partir de la protéine GFP. Ces recombinants ont été testés sur l'espèce cible du virus myxomateux servant de vecteur, le lapin, afin de tester l'effet pathogène du vecteur. Ils ont également été testés sur lapins, souris et moutons afin d'étudier la réponse immunitaire envers l'antigène.

Le virus myxomateux n'a pas eu d'effet pathogène chez ces trois espèces, y compris chez les lapins. Une production d'anticorps anti-GFP ou anti-M2e selon l'immunisation a été observée chez les lapins. Les souris immunisées avec un recombinant exprimant M2e en fusion ont également produit des anticorps anti-M2e. Afin de vérifier si une réponse cellulaire est également induite par cette immunisation, un mouton a été inoculé par le virus T1-N-Gfp-

M022L et une lymphoprolifération a été mise en évidence par comparaison à un mouton témoin [Bertagnoli *et al.*, 2011].

4.2. Utilisation de vecteurs autres que poxviraux en tant que vecteur chimère

Ainsi, les études utilisant les poxvirus en tant que vecteur exprimant des antigènes étrangers directement dans leur enveloppe sont assez peu nombreuses. De nombreux autres vecteurs, différents des poxvirus, sont utilisés à ces fins.

4.2.1. Vecteur de la famille des *Paramyxoviridae*

a. *Vecteur virus de la maladie de Newcastle (NDV) contre l'herpesvirus bovin (BHV-1)* [Khattar *et al.*, 2010]

Une équipe travaillant sur l'élaboration d'un vaccin anti BHV-1 a fait appel à la technique de fusion qui, dans ce cas, n'a pas donné les résultats attendus.

Le virus de l'herpesvirose bovine comporte 3 glycoprotéines majeures impliquées dans l'attachement et la pénétration de la cellule hôte. : gB, gC et gD. Ces trois protéines sont immunogènes et gD est considérée comme la cible principale d'anticorps neutralisants et de lymphocytes T cytotoxiques. Deux recombinants ont été élaborés à partir du virus de la maladie de Newcastle (NDV) souche LaSota: le premier exprimant la protéine gD du BVH-1 sans modification, l'autre exprimant une protéine gD chimère dont l'ectodomaine de gD est fusionné avec les domaines transmembranaire et cytoplasmique de la protéine F du NDV. Cette étude a montré que, contrairement aux études précédemment décrites, l'incorporation de la protéine gD chimère n'avait pas eu lieu de façon détectable sur le virion. De plus, le premier recombinant entraînait une meilleure réponse humorale chez les veaux que le recombinant utilisant la technique de fusion, après une seule inoculation intranasale ou intratrachéale. De plus, quelque soit le recombinant, aucun ne conférait une protection suffisante contre le BVH-1 par inoculation mucosale.

Dans le cas présent, la technique de fusion ne s'est pas avérée la plus immunogène.

b. *Vecteur Parainfluenza contre le virus Ebola* [Bukreyev *et al.*, 2009]

Un virus humain *Parainfluenza* de type 3 (HPIV3) a été utilisé comme vecteur pour des recherches contre le virus Ebola (EBOV). Bukreyev et ses collaborateurs ont réussi à créer un virus HPIV3, sans utiliser la technique de fusion, entièrement recouvert de la glycoprotéine GP de EBOV. Les protéines HN et F, les deux protéines d'enveloppe du virus *Parainfluenza*, avaient été délétées afin de trouver une alternative à l'immunité pré-existante chez les individus face au vecteur HPIV3. Ce virus atténué confère une protection contre une épreuve intrapéritonéale chez les cobayes ayant été immunisés auparavant par une seule inoculation intranasale.

Par contre, au tout début de cette même étude, les chercheurs pensaient ne pas pouvoir obtenir suffisamment d'incorporation de cette GP dans le virion ou ne pas obtenir de GP fonctionnelle. Ils ont donc anticipé ces potentiels problèmes en créant un recombinant dans

lequel la partie cytoplasmique de GP était remplacée par la partie cytoplasmique de la protéine F, protéine du virus *Parainfluenza* impliquée dans la fusion membranaire avec la cellule infectée. Or, l'effet inverse s'est produit avec cette construction. Cette construction réduit, plutôt que n'accroît, la production du virus infectieux. Il n'a pas pu être amplifié suffisamment pour une étude supplémentaire. Il se peut que la protéine chimère ait perdu sa conformation et sa fonctionnalité.

4.2.2. Vecteur de la famille des *Rhabdoviridae*

a. Vecteur du genre *Lyssavirus*

- contre la fièvre charbonneuse (« anthrax »).

Des virus recombinants exprimant une protéine de fusion entre la protéine de la nucléocapside du virus de la rage (extrémité C-terminale) et la GFP sont immunogènes contre GFP chez les souris (réponse humorale), contrairement aux autres recombinants qui avaient été élaborés sans la technique de fusion. Ainsi, l'immunogénicité envers l'antigène étranger est augmenté avec cette présentation. L'étude de l'équipe de Koser [Koser *et al.*, 2004] a démontré que cette protéine chimère était exprimée et incorporée dans le complexe ribonucléoprotéique du virus de la rage ainsi que dans les virions. Cette étude a été poursuivie pour intégrer d'autres antigènes et tenter de développer d'autres vaccins. Ceci est le cas de recherches menées par Smith et ses collègues [Smith *et al.*, 2006], dans le domaine de la vaccination contre la fièvre charbonneuse, aboutissant cette fois-ci à l'expression d'une protéine de fusion d'intérêt à la surface des cellules infectées ainsi qu'à la surface de l'enveloppe des virions.

La fièvre charbonneuse ou anthrax est causée par la toxine produite par *Bacillus anthracis* composée de 3 protéines dont l'antigène protecteur PA. Ce dernier est responsable de la fixation sur les membranes des cellules en s'associant à un récepteur ubiquiste. Il est alors clivé en deux fragments dont PA63 qui reste lié au récepteur. PA63 sert alors de ligand pour les deux autres protéines formant la toxine (facteur œdématogène et facteur létal) de *Bacillus anthracis*. Il a été démontré que la fixation entre PA et les récepteurs cellulaires peut-être empêchée par des anticorps anti-PA. Plus précisément, le domaine 4 RBD (« receptor binding domain ») de PA (RBD – 140 acides aminés) contient des épitopes suffisants pour induire une réponse protectrice dans le modèle souris et rat et il a donc paru intéressant d'utiliser ce domaine.

Plusieurs types de recombinants RV dont l'ectodomaine modifié de la glycoprotéine G était fusionné soit avec PA63 soit RBD ont donc été créés. Par infection de cellules avec une de ces chimères RV SPBN RBD-E51 (contenant 51 acides aminés de l'ectodomaine de G) (*cf. figure 12*) les cellules présentaient à leur surface la protéine chimère (mise en évidence par immunomarquage et Western blot) et cette protéine était correctement incorporée aux virions (mise en évidence de la présence de la protéine chimère dans les virions par Western Blot). Les souris immunisées par voie intra musculaire par des virus inactivés ou vivants RV SPBN-RBD-E51 ont montré un fort titre d'anticorps contre *B. anthracis* PA. Une lymphoprolifération a également été observée. Une analyse supplémentaire titrant les

anticorps en fonction de la dose infectante a été réalisée. Des épreuves de challenge afin de vérifier la protection conférée par ces anticorps nécessitent des études supplémentaires.

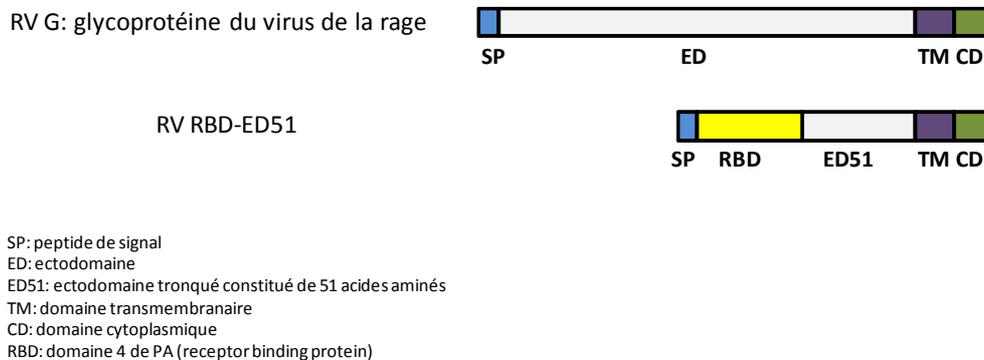


Figure 12: Structure générale de la glycoprotéine G du virus de la rage et de la protéine de fusion RV RBD-ED51.

Il s'avère que le virus de la rage est un virus très utilisé pour cette technique d'expression de l'antigène et d'autres équipes ont publié leurs travaux à ce sujet.

- contre la toxine botulinique

Un RV recombiné exprimant un fragment de la neurotoxine botulinique type A à été créé par l'équipe de Mustafa W et ses collègues [Mustafa *et al.*, 2011]. Les toxines botuliques sont produites sous forme inactives et sont activées par clivage, par des protéases bactériennes ou des enzymes digestives, en deux chaînes : une chaîne lourde HC de 100 kDa et une chaîne légère LC de 50 kDa. La toxine HC contient le domaine de fixation au récepteur cellulaire et de translocation. La portion 50kDa de la neurotoxine botulique HC (HC50) est un excellent outil pour l'élaboration de vaccin car elle est une potentielle cible d'anticorps neutralisants empêchant l'entrée de la toxine dans les cellules.

Sur le même principe de construction de recombinants RV utilisée dans l'étude de Smith et al [Smith *et al.*, 2006], ces chercheurs ont construits plusieurs types de protéines de fusion dont l'ectodomaine (plus ou moins tronqué) de la glycoprotéine G RV était fusionné à HC50 de la toxine botulique type A. Toutes ces protéines de fusion étaient exprimées à la surface des cellules infectées mais la plus forte expression était obtenue avec le recombinant RV HC50/A-E30 (ectodomaine de la protéine codée de 30aa) (*cf. figure 13*). Il a été ensuite démontré que cette protéine HC50/A-E30 était correctement incorporée dans les virions par Western blot. L'immunisation de souris (primo injection puis rappel) par le vecteur inactivé RV-HC50/A-E30 sans adjuvant, a entraîné l'apparition d'anticorps neutralisant la toxine botulique circulante et conférant une protection aux souris contre 1000 fois la dose létale de la toxine botulique (100% de survie). La production d'anticorps neutralisants avait également été comparée dans les cas d'immunisation avec le vecteur inactivé sans adjuvant et avec adjuvant (phosphate d'aluminium) mais aucune différence n'avait été notée après le rappel.

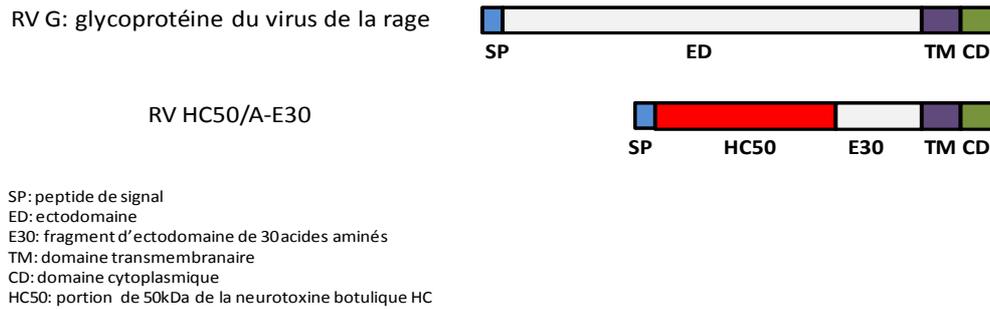


Figure 13: Structure générale de la glycoprotéine G du virus de la rage et de la protéine de fusion HC50/A-E30.

- contre le virus simien-humain de l'immunodéficience

Un RV recombiné exprimant les ectodomaine et domaine transmembranaire de la protéine d'enveloppe du virus simien-humain de l'immunodéficience (SHIV) fusionné au domaine cytoplasmique de la glycoprotéine G du RV a été élaboré, le gène d'origine codant pour la GP ayant été entièrement délété [McKenna *et al.*, 2004]. Une épreuve d'immunisation réalisée sur un macaque rhesus (2 injections à une semaine d'intervalle par voies sous-cutanée, intra-veineuse et intra-musculaire, 1 injection intraveineuse à la semaine 19) a montré une séroconversion à la fois contre la protéine d'enveloppe du HIV-1 et contre la nucléoprotéine du RV, une réponse cellulaire spécifique de la protéine d'enveloppe du SHIV et a conféré une protection chez ce macaque. Cette construction reprise de l'étude de l'équipe de Foley [Foley *et al.*, 2002] avait le même tropisme *in vitro* que le HIV-1 et infectait les cellules humaines dendritiques, c'est pourquoi elle a été testée sur macaque.

b. Vecteur du genre Vesiculovirus

Des études similaires ont été publiées en utilisant le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). L'équipe de Schnell [Schnell *et al.*, 1996] a montré, par microscopie électronique et par utilisation d'anticorps anti-Glycoprotéine VSV et anticorps anti-CD4, qu'il y a bien incorporation d'une protéine de fusion constituée des domaines cytoplasmique et transmembranaire de la glycoprotéine G du VSV et de l'ectodomaine de CD4 dans l'enveloppe des virions.

Ces études ont été par la suite poursuivies [Schnell *et al.*, 1998] en vue de préciser le rôle du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine du VSV en créant des recombinants dont chaque domaine est alternativement remplacé par celui de CD4.

Selon une étude de Owens et ses collaborateurs [Owens et Rose, 1993] qui utilise également des protéines de fusion avec des domaines de la protéine d'enveloppe du HIV-1 gp160 (HIV-1 Env), le domaine cytoplasmique de la GP contiendrait des signaux spécifiques permettant l'assemblage et l'incorporation de protéines étrangères dans l'enveloppe des virions. Cependant, selon l'équipe de Schnell [Schnell *et al.*, 1998], ces signaux ne seraient pas spécifiques et l'équipe de Owens n'aurait pas pris en compte qu'il existerait des signaux empêchant la localisation de la protéine env-HIV-1 sur les sites de bourgeonnement du VSV,

ce qui erronerait les conclusions. Des interactions non spécifiques entre le domaine cytoplasmique et la nucléocapside ou les protéines matrices (protéine M du VSV) permettraient le bourgeonnement. Remplacer le domaine transmembranaire et/ou cytoplasmique de GP par ceux/celui de CD4, ayant une séquence différente mais une longueur du domaine cytoplasmique similaire à celui de GP, ne modifierait pas l'incorporation et le bourgeonnement.

Cette fois-ci dans le but d'améliorer l'immunogénicité d'un vecteur, une protéine de fusion entre la glycoprotéine G VSV dont le domaine cytoplasmique est tronqué (constitué d'un seul acide aminé) et l'hémagglutinine HA du virus influenza accolée au domaine cytoplasmique tronqué de G a été créé par l'équipe de Roberts [Roberts *et al.*, 1999]. Avant l'élaboration de cette construction, il avait été constaté qu'un recombinant VSV exprimant HA dans une construction classique juxtaposant le gène HA au gène de G entraînait une pathogénicité due au vecteur lui-même chez des souris (perte de poids, baisse d'activité, baisse de toilettage). Le but était donc de construire un recombinant atténué aboutissant à une protection anti-HA chez les souris d'où la construction d'un recombinant exprimant la protéine de fusion chimère présentée ci-dessus. Cette dernière est incorporée dans le virus recombinant et une inoculation intranasale à des souris n'entraîne pas de signes cliniques. Ces souris présentent des anticorps anti-HA ainsi que des anticorps anti-glycoprotéine G VSV. Une injection d'influenza virus après immunisation des souris par ce recombinant aboutit à 100% de survie et à l'absence de signes cliniques. La réponse cellulaire n'a pas été examinée dans cette étude.

4.2.3. Vecteur de la famille des *Orthomyxoviridae*

L'hémagglutinine HA du virus Influenza est une glycoprotéine antigénique de surface responsable de la fixation de la particule virale à la cellule cible. Il avait été démontré par Hatziioannou et ses collègues qu'il était possible d'intégrer à l'extrémité N terminale de HA (sous-type 7), sans affecter sa capacité de fusion, différents polypeptides jusqu'à 246 acides aminés et qu'ils étaient exprimés à la surface des cellules et dans les virions [Hatziioannou *et al.*, 1999]. Sur ce même principe, une équipe de chercheur [Li *et al.*, 2005] a fusionné, dans deux modèles différents, le domaine 1 LEF (90 acides aminés) de l'antigène protecteur PA de *B. anthracis* (responsable de l'attachement avec les facteurs létal et œdématogène formant la toxine) et le domaine 4 RBD (140 acides aminés) de PA (domaine d'attachement au récepteur cellulaire), à l'ectomaine de HA (sous-type 3). Ces deux domaines ont été insérés entre le signal peptidique SP de l'HA et le résidu glutamine à l'extrémité N terminale après clivage avec SP (*cf. figure 14*). Ces protéines chimères sont exprimées à la surface des cellules infectées et incorporées dans les particules virales. Cela n'a pas eu de répercussion néfaste sur l'infectivité et la réplication virale. L'immunisation de souris par une seule inoculation intranasale de virus recombinants entraîne la production d'anticorps anti-PA et anti-HA.

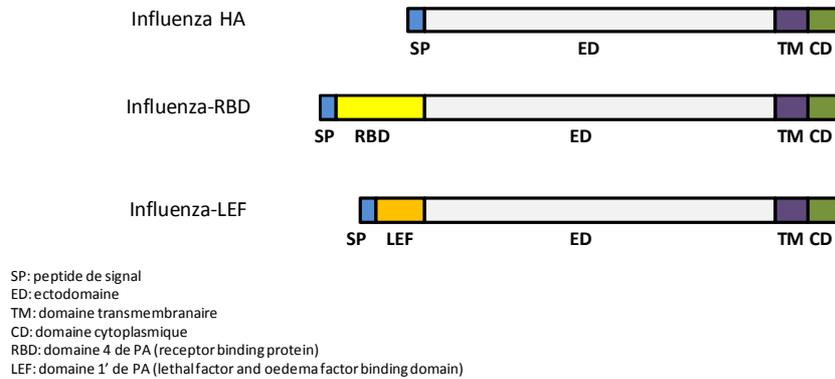


Figure 14: Structure générale de l'hémagglutinine HA du virus Influenza et des protéines de fusion Influenza-RBD et Influenza-LEF.

L'équipe de Langley [Langley *et al.*, 2010] a utilisé les recombinants décrits pour l'étude de Li et ses collaborateurs [Li *et al.*, 2005] (Influenza-RBD et Influenza LEF) et les recombinants de l'étude de Smith et ses collègues [Smith *et al.*, 2006] (Rabies-RBD) (*cf. figures 12 et 14*). Des virus de la vaccine VV exprimant des protéines chimères HA/RBD ou HA/LEF ont également été utilisés (vecteur classique sans utilisation de la technique de fusion de protéine). Ces chercheurs ont utilisé différents protocoles d'immunisation de souris en utilisant soit une injection de rappel homologue au premier recombinant injecté soit hétérologue puis ont titré les anticorps anti-PA, anti-LEF, anti-RBD et les titres d'inhibition d'hémagglutination. Il est ressorti de cette étude que l'utilisation d'un vecteur vivant influenza par voie intranasale en première injection suivie d'un rappel par voie intramusculaire par le vecteur inactivé RV ou par le virus recombinant VV induit des titres en anticorps plus importants que tous les autres protocoles de vaccination (homologue ou autre type hétérologue). De plus, un test *in vitro* de neutralisation de toxine de l'anthrax a été réalisé à partir de certains sérums de souris immunisées auparavant. Dans plusieurs cas, une activité de neutralisation de la toxine a été constatée (test MTT sur macrophages). La neutralisation la plus importante constatée concernait les souris immunisées en primoinjection par un vecteur Influenza-RBD et ayant reçu un rappel par le vecteur RV-RBD. Aucune neutralisation n'a été observée pour les souris ayant reçu une primoinjection du vecteur recombinant RV RBD. D'autres tests de neutralisation de toxine doivent être réalisés sur d'autres modèles animaux ainsi que des épreuves de challenge avec spore de *B. anthracis*.

Toutes ces études ont pour but, d'une façon générale, d'améliorer l'immunogénicité du vecteur en faisant exprimer la protéine chimère de fusion sur la particule virale. Cette technique permet également bien souvent de comprendre ou de préciser des mécanismes du cycle viral, le rôle de certaines protéines, le rôle des différents domaines de protéines membranaires...

Ce fut notamment le cas pour comprendre le rôle de la glycoprotéine G du virus de la rage et son importance pour l'incorporation de protéines dans l'enveloppe [Mebatsion et Conzelmann, 1996], pour montrer la nécessité de la présence de la glycoprotéine G du virus de la rage dans la mise en place d'une protection contre l'infection [Foley *et al.*, 2000], pour préciser le rôle du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse comme évoqué déjà précédemment [Owens et Rose, 1993 ; Schnell *et al.*, 1998]...

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

Comme nous l'avons évoqué en première partie, le virus myxomateux, souche atténuée SG33, est un virus ayant déjà fait ses preuves comme vecteur potentiel chez les ruminants. De nombreux travaux ayant porté leur intérêt sur la protéine VP2 pour la vaccination des ovins contre le BTV se sont montrés encourageants et la protéine VP2 nous a paru de ce fait un antigène particulièrement intéressant. De nombreuses études, aussi bien concernant les vecteurs poxviraux ou d'autres familles de vecteurs, ont témoigné de l'intérêt de faire exprimer une protéine chimère antigénique directement sur la particule virale afin d'améliorer le vecteur. Rappelons que l'équipe INRA-ENVIT au sein de l'UMR Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP) a identifié deux protéines d'enveloppe des *Leporipoxvirus* (M071L et M022L) qu'il est possible de fusionner avec un antigène d'intérêt sans que cela n'altère leurs fonctions.

M071L est une protéine intégrée à la membrane des formes IMV qui constitue un antigène dominant. Elle est impliquée dans la maturation des particules virales. M022L est une protéine de l'enveloppe des formes EEV qui est impliquée dans la formation des membranes des IEV.

L'équipe a démontré qu'en fusionnant une protéine étrangère à l'extrémité C-terminale de M071L, la protéine fusionnée est exprimée de façon équivalente à la protéine M071L d'origine, à la surface des formes IMV, sans altérer la morphogénèse virale. De la même manière, il est possible de fusionner une protéine à l'extrémité N-terminale de M022L sans altérer la fonction de cette protéine, ce qui permet d'exprimer cette protéine à la surface des virions EEV.

Ainsi, deux virus recombinants VP2-M022 et M071-VP2 ont été créés (antérieurement à cette étude) et leur immunogénicité est évaluée chez des souris, par comparaison à un virus recombinant exprimant la protéine VP2 de façon plus classique. Cette immunogénicité est évaluée chez une espèce non cible de laboratoire (vecteur non répliquatif) pour des raisons de praticité et de coût puisque ces mêmes expériences sur moutons seraient beaucoup plus contraignantes. Ces deux virus recombinants ont déjà été testés dans un contexte répliquatif chez les lapins qui ont présenté une réponse humorale après immunisation (sérums positifs en immunofluorescence) (S. Bertagnoli, communication personnelle).

I. Principe de construction des virus recombinants

1.1. Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 - VP2 (*cf. figure 15*)

1.1.1. Construction et structure des plasmides de transfert

- Le gène de VP2 est cloné sous la dépendance du promoteur précoce-tardif p7.5 du VACV.
- Parallèlement, les gènes M9L et M12L encadrant le site choisi pour l'insertion du transgène VP2 sont clonés.

- Après amplification par PCR du transgène et du promoteur p7.5, celui-ci est inséré entre les gènes M9L et M12L.
- Enfin, la cassette de sélection *Ecogpt* (*E. coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransférase) a été insérée dans le plasmide ainsi obtenu.

1.1.2. Obtention et structure des virus recombinés

Les virus recombinés sont obtenus après recombinaison homologue au cours d'une infection des cellules rénales de lapin (RK13) par le virus myxomateux SG33 et d'une transfection simultanée par le plasmide de transfert d'intérêt obtenu précédemment.

Les virus recombinés sont identifiés à l'aide de la cassette de sélection *Ecogpt*. Ce gène de la guanosine phosphoribosyl transférase d'*Escherichia coli* code pour une résistance à l'acide mycophénolique (MPA) (inhibiteur du métabolisme des purines). On ajoute de l'acide mycophénolique bloquant la réplication des virus sauf si celui-ci exprime le gène *Ecogpt* et l'on ajoute dans le milieu de culture de la xanthine et de l'hypoxanthine.

1.1.3. Contrôle de l'expression des gènes étrangers insérés

Afin de vérifier l'expression du transgène, un marquage immunologique avec des anticorps anti-VP2 a été réalisé sur cellules infectées.

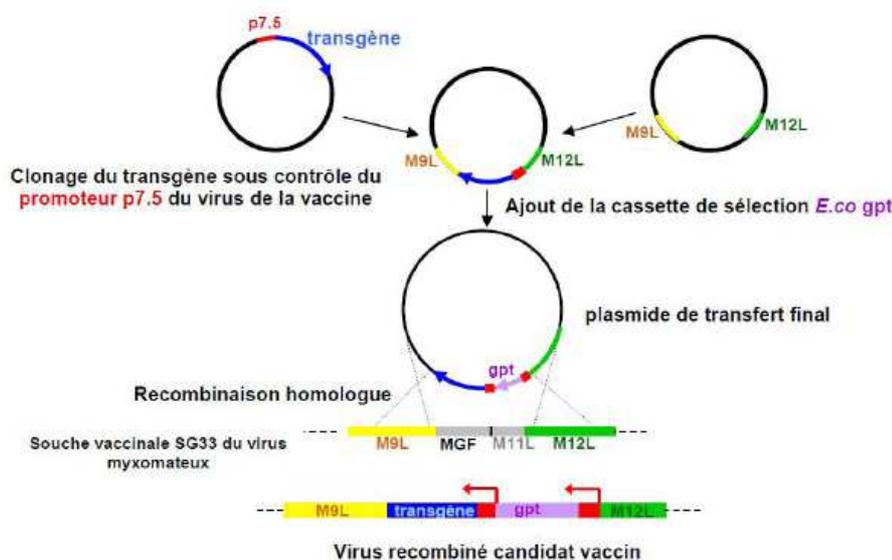


Figure 15: Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 - VP2.

1.2. Principes de construction des virus recombinés myxomateux SG33 M022L-VP2 et SG33 M071L-VP2 (cf. figures 16 et 17)

1.2.1. Construction et structure des plasmides de transfert.

a. *Construction de M071L-VP2*

Le plasmide de transfert final pGEMT-M071L-VP2 est obtenu à partir de deux plasmides : pGA15-VP2sBTV8 (GeneArt) et pGEMT-M071L (INRA).

Ces derniers sont clonés grâce à des bactéries compétentes DH-5alpha.

Le plasmide pGEMT-M071L subit une double digestion par les enzymes de restriction Pst I puis Xho I. Une PCR est réalisée sur pGA-VP2. Les amorces utilisées ajoutent deux sites de restriction : Pst I et Xho I sur le gène codant pour la protéine VP2.

Le plasmide final pGEMT-M071L-VP2 est alors obtenu par ligation de l'insert obtenu et du plasmide pGEMT-M071L.

Les bactéries *E.coli* transformées sont ensuite criblées puis les différents clones sont séquencés afin de retenir le plasmide de transfert d'intérêt souhaité.

b. *Construction de VP2-M022L*

Sur le même principe, le plasmide de transfert final pGEMT-VP2-M022L est obtenu à partir des plasmides pGA15-VP2sBTV8 (GeneArt) et pGEMT-M022L (INRA). Le plasmide pGEMT-M022L subit une double digestion par les enzymes de restriction Nco I et EcoR I. Une PCR est réalisée sur le plasmide pGA-VP2 et les amorces utilisées ajoutent les sites de restriction Nco I et EcoR I sur le gène codant pour la protéine VP2. Le promoteur M022L est également ajouté à l'extrémité amino-terminale de VP2 car il avait été enlevé lors de la digestion.

Le plasmide final pGEMT-M022L-VP2 est obtenu par ligation de l'insert et du plasmide pGEMT-M022L.

La fusion du gène codant pour VP2 se fait en C-terminal de M071L et en N-terminal de M022L.

1.2.2. Obtention et structure des virus recombinés

Les virus recombinés sont obtenus et sélectionnés selon les mêmes principes que la construction du recombinant VP2-SG33 décrits dans le *paragraphe 1.1.2.*

1.2.3. Contrôle de l'expression des gènes étrangers insérés

Afin de vérifier l'expression des protéines fusionnées, un marquage immunologique avec des anticorps anti-VP2 a été réalisé sur cellules infectées.

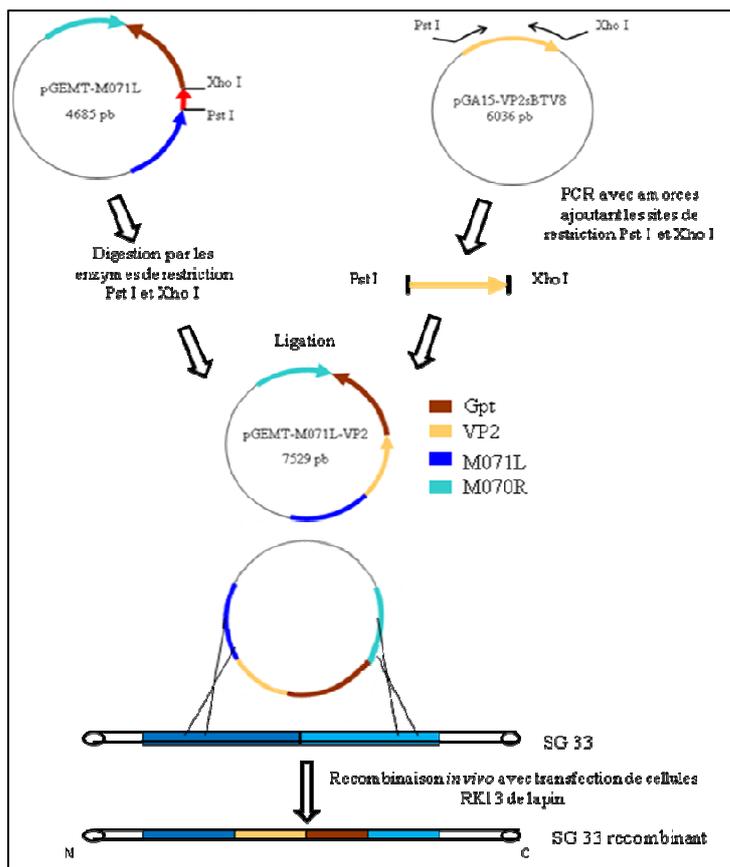


Figure 17: Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 M071L-VP2.

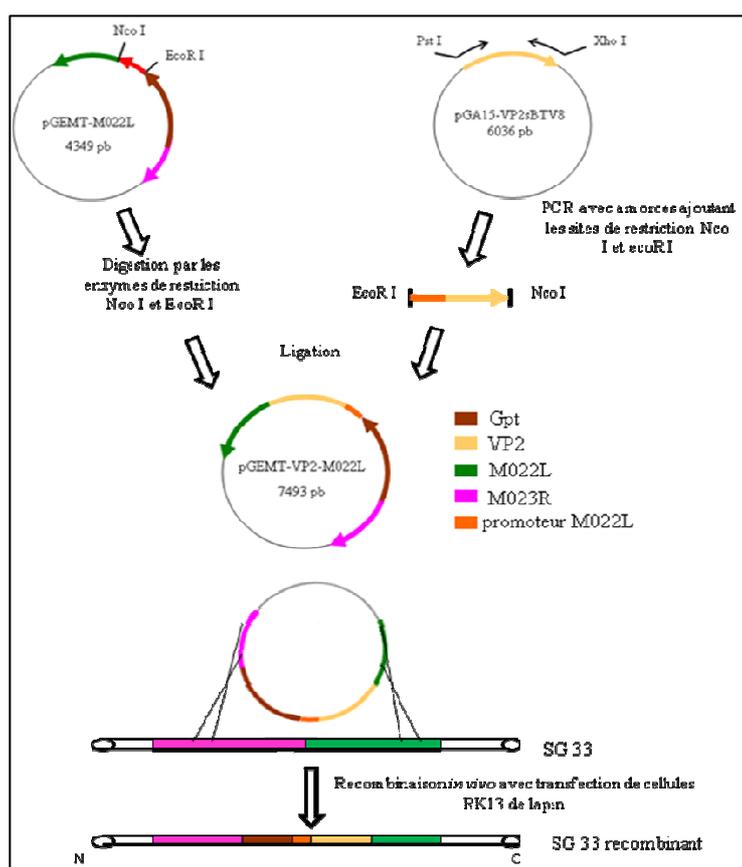


Figure 17 : Principe de construction du virus recombiné myxomateux SG33 VP2-M022L.

II. Matériel et méthodes

2.1. Protocole vaccinal

2.1.1. Lots expérimentaux de souris

Les souris utilisées sont de souche C57B femelles, âgées de 5 semaines à réception.

Les souris sont réparties en 6 cages, 4 à 6 souris par cage

- 1 cage témoin SG33 (6 souris) recevra 3 injections de 200µl de virus myxomateux (VM) SG33 en sous-cutané
- 1 cage témoin BTV-8 (6 souris) recevra 3 injections de 200µl de BTV-8 en intra péritonéal
- 2 cages (4 et 5 souris) recevront 3 injections de 200µl de VM VP2-M022L en sous-cutané
- 2 cages (5 et 5 souris) recevront 3 injections de 200µl de VM M071L-VP2 en sous-cutané
- 2 cages (4 et 5 souris) recevront 3 injections de 200µl de VM SG33-VP2 en sous-cutané.

Les virus myxomateux sont dilués à la concentration de 10^7 pfu/100 μ l (en DMEM sans sérum ni antibiotique).

Cage 1 : 6 souris Lot SG33	Cage 3: 4 souris VP2-M022L	Cage 5: 5 souris M071L-VP2	Cage 7 : 4 souris SG33-VP2
Cage 2 : 6 souris Lot BTV-8	Cage 4 : 5 souris VP2-M022L	Cage 6 : 5 souris M071L-VP2	Cage 8 : 5 souris SG33-VP2

Tableau 3: Répartition des souris dans chaque cage.

Ces cages sont réparties selon deux séries de souris qui seront soumises à deux protocoles différents.

La série 1 est composée de :

- 3 souris de la cage 1
- 3 souris de la cage 2
- la totalité des souris de la cage 3
- la totalité des souris de la cage 5
- la totalité des souris de la cage 7

La série 2 est composée des souris restantes.

Chaque souris a été identifiée par une couleur apposée sur la queue tout au long de l'expérience.

Notation : Par la suite, chaque souris portera un numéro de la forme xy , x correspondant au numéro de la cage et y correspondant à sa couleur.

2.1.2. Interventions

Les virus sont inoculés à toutes les souris à J0, J30. La troisième injection est à J58 pour la série 1 ou J72 pour la série 2. Quatorze jours après la dernière injection, les souris sont anesthésiées et sacrifiées, leur rate est prélevée.

Des prises de sang sous-maxillaire ou rétro-orbitaires sont effectuées à J0, J30, J51 pour toutes les souris. Les dernières prises de sang ont lieu le jour du sacrifice soit à J72 pour la série 1 et à J86 pour la série 2 (*cf. figures 18 et 19*). Le sang prélevé est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min, et le sérum est congelé en attente de l'analyse sérologique par immunofluorescence à -20°C .

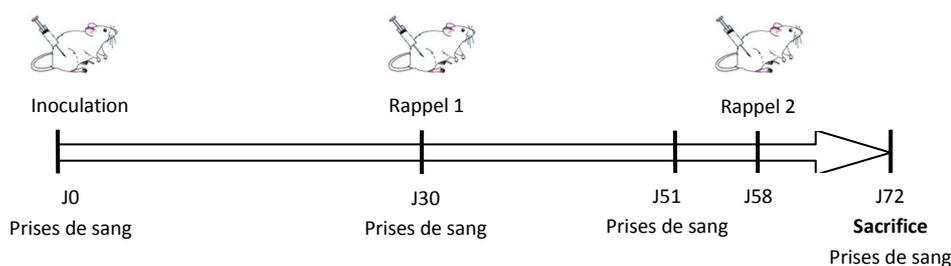


Figure 18: Représentation schématique du protocole vaccinal pour la première série de souris.

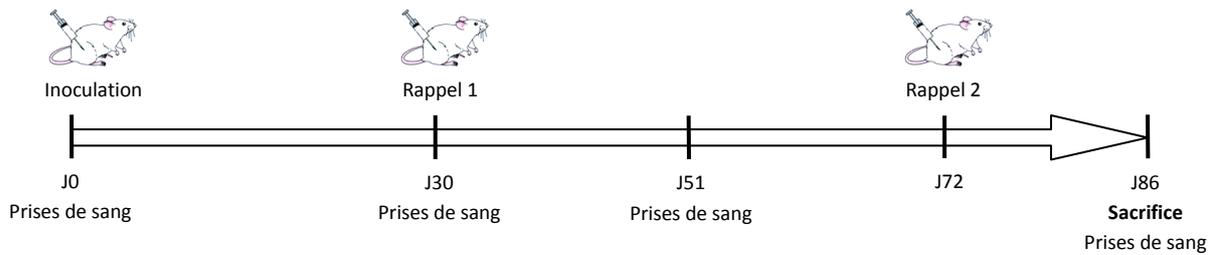


Figure 19: Représentation schématique du protocole vaccinal pour la deuxième série de souris.

2.2. Préparation des splénocytes

2.2.1. Prélèvement des rates

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange de 0,05mL de Rompun® (xylazine) et 0,05mL d’Imalgène 1000® (kétamine) par voie intramusculaire. Après incision de la cavité abdominale, la rate est prélevée et déposée dans un tube Falcon® de 15mL contenant 5mL de milieu complet*.

**milieu complet : DMEM complété par 2mmol de glutamine (ou utilisation de DMEM déjà complété en L-glutamine), 25mmol d’hepes, 0,1mmol de β -mercaptoéthanol, 1mmol de pyruvate de sodium, du sérum de veau fœtal 10%, 100 μ g/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine.*

2.2.2. Purification des splénocytes

Les rates sont dilacérées à l’aide d’un piston de seringue de 5mL puis le contenu de chaque puits (plaque P6) est versé dans un tube identifié de 15mL muni de filtre nylon de 100 μ m (filtre falcon). Ces tubes sont ensuite centrifugés à 20°C durant 5 minutes à la vitesse de 300g. Le surnageant est éliminé et 1mL de tampon ACK* (tampon de lyse des globules rouges) est ajouté au culot, remis en suspension.

**tampon ACK : acide chlorhydrique tamponné à 7,2-7,4 complété par du chlorure d’ammonium à 155mmol/L, de l’hydrogénocarbonate de potassium à 10mmol/L et de l’EDTA à 0,1mmol/L.*

Les tubes sont incubés à température ambiante durant sept minutes au bout desquelles la réaction est arrêtée en ajoutant 5mL de milieu complet. Les tubes sont centrifugés avec les mêmes paramètres que précédemment. Les culots sont lavés deux fois (élimination du surnageant puis ajout de 5mL de milieu complet).

Pour chaque échantillon, 20 μ L de la solution sont ajoutés à 20 μ L de PBS (dilution 1/2). Puis, 15 μ L de cette solution sont prélevés puis ajoutés à 30 μ L de Bleu Trypan (dilution 1/3). Les cellules sont ensuite comptées manuellement avec une cellule de Thoma.

Prévoir deux tubes : le premier contenant 5.10⁶ cellules/mL pour le marquage intracellulaire et l’ELISA, le deuxième contenant 10.10⁶cellules/mL pour le marquage CFSE.

2.3. Protocole d'analyse de la réponse cellulaire

2.3.1. Choix des peptides VP2 pour les stimulations des splénocytes

Disposant de plusieurs peptides VP2 de 20 acides aminés à l'unité UMR 1225 IHAP de l'ENVT, une quinzaine de peptides ayant la plus forte affinité avec le CMH de notre souche de souris a été sélectionnée. Ils seront utilisés lors des stimulations des splénocytes pour le marquage intracellulaire, pour les ELISA et le CFSE.

L'affinité de chaque séquence de peptide VP2 avec deux allèles H2-Db et H2-Kb du CMH de notre souche de souris a été calculée [Hans-Georg Rammensee *et al.* via <http://www.syfpeithi.de/home.htm>].

Les peptides ayant un score d'affinité supérieur ou égal à 23 sont retenus. Ainsi, 6 peptides ayant un score de 25 ou 26 et 9 peptides ayant un score égal à 23 ou 24 ont été utilisés par la suite.

2.3.2. Mise en culture des cellules

a. Stimulation pour le marquage intracellulaire

Chaque suspension de cellules purifiées à $5 \cdot 10^6$ /mL est ensuite répartie dans 4 puits à fond plat de plaque 24 puits de façon à avoir 1mL par puits, chaque puits d'un même échantillon subissant une stimulation différente. Ainsi on ajoute selon le puits 1mL :

- de milieu complet (témoin négatif)
- de PMA-Iono (PMA : 50ng/mL, Iono 500ng/mL) (témoin positif stimulant la production des IFN, IL-2, IL-4 et perforine)
- de peptides VP2 poolés (à 2x au final)
- d'une suspension SG33 inactivée (MOI final =1).

Les plaques sont laissées à l'étuve à 37°C pendant 3 heures puis la bréfeldine est ajoutée. La bréfeldine qui bloque la sécrétion de cytokines des LT (fournie dans le kit cytoperm/cytofix Becton Dickinson) y est ajoutée à la concentration finale de 10µg/mL.

La bréfeldine est laissée en contact avec les cellules 12h maximum puis les plaques sont transférées à 4°C le temps de poursuivre le traitement de celles-ci.

Au terme de cette incubation les cellules sont centrifugées à 20°C, durant 5 minutes à la vitesse de 300g. Les surnageants sont ensuite éliminés et les culots sont remis en suspension dans 800µL de tampon FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting–PBS/BSA 0,5%/2,5mM EDTA). Les tubes sont une nouvelle fois centrifugés comme précédemment puis conservés à 4°C.

b. Stimulation pour les ELISA (dosage des cytokines produites par les lymphocytes CD4+)

Dans des plaques 24 puits à fond conique, on verse 500 μ L par puits de cellules purifiées à 5.10⁶ cellules/mL.

La stimulation des cellules se fait selon le même principe que précédemment en versant 1mL de réactif par puits :

- de milieu complet
- de PMA-Iono (PMA : 50ng/mL, Iono 500ng/mL)
- de peptides poolés
- d'une suspension de SG33 inactivée (MOI final=1)

Les plaques sont ensuite placées à l'étuve à 37°C. Au bout de 24 heures, 500 μ L 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 24 heures. Ainsi, 48 heures après le début de la stimulation les 500 μ L restants de surnageant sont récupérés et stockés à -20°C en attendant leur analyse.

c. Marquage et stimulation pour le CFSE (étude de la prolifération des lymphocytes)

La lampe de la hotte étant éteinte, pour chaque souris (10⁷ cellules/mL), on ajoute 110 μ L d'une solution de PBS dans une zone propre au sommet du tube. Resuspendre 1,1 μ L de CFSE dans le PBS et mélanger le tube par inversion. Au bout de 5 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant 50mL de PBS 5% SVF. Les cellules sont centrifugées à 20°C durant 10 minutes à 300g et le surnageant est éliminé. Deux autres lavages sont réalisés de la même façon et, après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 1mL de milieu complet.

Dans des plaques 96 puits à fond conique (remplacées par des tubes Facs à la deuxième expérience), chaque tube est réparti dans 4 puits à raison de 100 μ L par puits. Dans chaque puits, on ajoute 100 μ L par puits du réactif correspondant, à savoir :

- un puits non stimulé complété par du milieu complet
- un puits stimulé avec du Con A (1 μ g/mL)
- un puits stimulé avec le pool de peptides
- un puits stimulé avec la souche SG33 inactivée (MOI=1)

Un contrôle avec des cellules sans CFSE est également réalisé.

Les plaques sont ensuite placées dans l'étuve à 37°C. Après cinq jours d'incubation, les cellules sont transférées en microtubes 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.

d. Marquage intracellulaire

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

- CD90.2-FITC et IFN γ -APC
- CD90.2-FITC et IL2-PE

Les plaques sont centrifugées trois minutes à 400g puis le surnageant est éliminé et les culots sont remis en suspension dans 150µL de solution de blocage (Mouse FCR Block Becton) diluée au 50^{ème} dans du tampon FACS. Les plaques sont laissées quinze minutes à 4°C puis 50µL par puits d'AC de surface dilués au 50^{ème} dans du tampon FACS sont ajoutés (CD3).

Les plaques sont laissées une nouvelle fois à 4°C, pendant 20 minutes, puis elles sont centrifugées à 20°C durant cinq minutes à 350g. Le surnageant est jeté et les cellules sont remises en suspension dans 150µL de tampon FACS. Une seconde centrifugation est réalisée et après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 100µL de tampon Cytoperm/cytofix (Becton).

Les plaques sont laissées vingt minutes à 4°C puis centrifugées à 4°C durant cinq minutes à 400g. Les culots sont remis en suspension dans 150µL 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 50µL de la solution d'AC intracellulaires (IL-2, IFN γ) 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 150µL par puits de tampon perm/wash dilués au 10^{ème} dans du tampon FACS et ensuite les deux suivants avec 150µL/puits de tampon FACS. Les cellules sont reprises dans 150µL de tampon FACS et directement analysées avec le cytomètre en flux (Facsalibur Becton Dickinson).

Environ 50000 lymphocytes sont enregistrés.

Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel Flow Jo.

2.3.3. Protocole ELISA :

Nous avons utilisé le kit DuoSet ELISA mouse IL-2 de R&D Systems contenant :

- des anticorps de capture à la concentration initiale de 180µg/mL
- des anticorps de détection à la concentration initiale de 72µg/mL
- une solution standard à la concentration initiale de 100ng/mL
- 1mL de Streptavidin-HRP.

Les plaques ELISA 96 puits sont chargées de 100µL d'AC de capture dilués dans du PBS à la concentration de travail de 1µg/mL puis laissées à incuber une nuit à température ambiante. Elles sont lavées trois fois avec du PBS Tween 0,05% puis 300µL de solution bloquante (PBS 1%BSA) sont ajoutés dans chacun des puits. Ces plaques sont ensuite laissées une heure minimum à température ambiante puis subissent 3 lavages. Pour chacune des plaques, une

gamme standard est réalisée avec 100µL par puits de solution standard diluée à la concentration souhaitée dans du Reagent Diluent (0,1% BSA, 0,05% Tween 20, Tris-Buffered Saline (20mM Trizma base, 150mM NaCl)). La concentration maximale de cette gamme est de 1000pg/mL et des dilutions successives au demi sont réalisées afin d'obtenir une courbe standard de 8 points. 100µL de chacun des échantillons à tester sont également répartis en duplicatas sur les plaques. Les plaques, protégées par du film plastique, sont laissées 2 heures à température ambiante. Les plaques sont de nouveau lavées trois fois puis 100µL d'AC de détection dilués dans du Reagent Diluent à la concentration de travail de 400ng/mL sont ajoutés. Les plaques sont à nouveau conservées 2 heures à température, protégées par du film plastique. Après 3 lavages, 100µL par puits de Streptavidin-HRP diluée au 1/200 dans du Reagent Diluent sont ajoutés et les plaques sont gardées 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après 3 lavages, 100µL de solution substrat (mélange au 1 : 1 de H2O2 et de Tetramethylbenzidine) sont ajoutés et les plaques sont laissées à incuber 20 minutes à température ambiante, toujours à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par 50µL de solution stop (acide sulfurique à 1mol/L). Les plaques sont lues avec un lecteur d'ELISA (VersaMax) à la longueur d'onde de 450nm (correction à 630nm appliquée).

2.4. Protocoles d'analyse de la réponse humorale (immunofluorescence)

Les plans des « labteks » sont à concevoir avant de réaliser ce protocole.

2.4.1. Infection à J0 :

Le virus est réfrigéré à +4°C.

Selon les « labteks » souhaitées,

- les cellules sont infectées par BTV8 (MOI 0,5) (virus dilué en DMEM 3% SVF)
- soit les cellules sont infectées par SG33 (MOI 0,5)
- soit les cellules ne sont pas infectées.

L'inoculum est laissé pendant 2 heures puis remplacé par 200µl de DMEM 3% SVF.

2.4.2. Fixation des cellules à J2 :

Le PFA est mis à +4°C. Le milieu est retiré des « labteks ». Une série de rinçage est ensuite réalisée : 1 rinçage en PBS, 1 rinçage en PFA puis les cupules sont remplies de PFA. Les labteks sont alors laissées à incuber 1h30 à température ambiante puis 3 rinçages en PBS sont réalisés. Les « labteks » sont laissées en milieu PBS jusqu'à l'étape suivante.

2.4.3. Perméabilisation à J3 :

Le PBS est remplacé par du triton X100 0,1% en PBS. Les « labteks » sont laissées à incuber pendant 30 minutes à température ambiante. 3 rinçages PBS sont ensuite réalisés.

2.4.4. Marquages

Les anticorps primaires utilisés selon les cupules sont :

- les sérums des souris obtenus expérimentalement (dilutions en PBS tween 0,05%)
- les anticorps anti-VP2 : Pourquier (1/1000^{ème})
- les anticorps anti-SG33 : sérum à J51 de souris infectées SG33 non recombinant. Des dilutions successives ont été réalisées selon les résultats attendus.
- les anticorps anti-BTV : sérum de souris infectées BTV8 à J51 ou Jfinal selon l'expérience. Des dilutions successives ont été réalisées selon les résultats attendus.
- les sérums à J0 d'une souris ci-dessus, issues des cages BTV ou SG33 (1/50^{ème})
- les anticorps anti-myxomatose : sérum souris infectée par le recombinant SG33 M2 (testé préalablement en ELISA)

Les « labteks » sont ensuite laissées à incuber 1 heure à 37°C puis 3 rinçages sont réalisés en PBS tween. Les anticorps secondaires utilisés pour toutes les cupules (même sans anticorps primaire) sont les anticorps anti-souris couplés FITC dilués au 1/200^{ème}. Après leur ajout, les labteks sont laissées à incuber 1 heure à 37°C puis 3 rinçages en PBS tween puis 1 rinçage PBS sont effectués. Du milieu de montage Dako fluorescent mounting medium est ajouté. Les labteks sont ensuite observées au microscope à fluorescence.

III. Résultats

3.1. Analyse de la réponse humorale, tests d'immunofluorescence

Plusieurs séries de tests d'immunofluorescence ont été réalisées.

Le premier test a pour but de vérifier qu'il y a bien production d'anticorps anti-virus myxomateux SG33 chez les souris vaccinées SG33 (issues de la cage 1) et d'anticorps anti-BTV8 chez les souris vaccinées BTV8 (issues de la cage 2). Il sert également à identifier une dilution optimale afin d'obtenir une bonne observation pour la suite des expériences.

Le deuxième a été réalisé à dilution optimale (dilution au 50^{ème}) afin d'identifier si les souris vaccinées issues des cages 3,5 et 7 présentent une réponse humorale.

Ces deux premiers tests réalisés à partir des sérums obtenus après le premier rappel de vaccination à J51 nous ont permis de tirer des premières conclusions et de nous encourager à poursuivre cette expérience en testant la plupart des sérums obtenus après les deux rappels de vaccination.

Premier test

Les sérums de souris utilisés lors de cette expérience sont ceux prélevés à J51 soit 21 jours après le premier rappel de vaccination. Les sérums étant à J51, le dernier rappel n'avait pas encore été réalisé.

Notation : Rappelons que les souris portant un nombre de type « 1y » sont issues de la cage 1 c'est-à-dire ayant été vaccinées SG33. De même, les souris portant un nombre de type « 2y » sont issues de la cage 2 c'est-à-dire ayant été vaccinées BTV8. Le « y » correspond au code couleur de chaque souris.

Les résultats obtenus sont présentés sous formes de tableaux (cf. tableaux 4, 5 et 6). Chacune des labteks a été observée au microscope à immunofluorescence.

Nous avons ainsi pu distinguer des souris ayant une réaction humorale très importante (notée 3+), importante (notée 2+), modérée à faible (notée +) ou absente (notée -). Les cases identifiées ± correspondent à une immunofluorescence très faible.

Sur cellules non infectées		
	Identifiant de la souris	Dilution au 1/50ème
Cage 1 SG33	11	-
	12	-
	13	NT
	14	-
	15	NT
	16	NT
Cage 2 BTV-8	21	NT
	22	-
	23	NT
	24	-
	25	-
	26	NT
Témoin cellulaire = cupules n'ayant reçu aucun sérum, uniquement du milieu complet		-

Tableau 4: Représentation des résultats de lecture de fluorescence obtenus sur cellules non infectées avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).

Notations :

- : absence de fluorescence, NT : sérum de souris non testé

Sur cellules infectées BTV-8				
	Identifiant de la souris	Dilutions		
		1/50ème	1/100ème	1/200ème
Cage 1 SG33	11	-	-	-
	12	-	-	-
	13	NT	NT	NT
	14	-	-	-
	15	NT	NT	NT
	16	NT	NT	NT
Témoin "anticorps primaires anti-virus myxomateux"		-		
Témoin "sérum à J0 de la souris 14 utilisé comme anticorps primaires"		-		
Cage 2 BTV-8	21	NT	NT	NT
	22	++	++	++
	23	NT	NT	NT
	24	++	+	+
	25	++	+	+
	26	NT	NT	NT
Témoin "anticorps primaires anti-VP2"		++		
Témoin "sérum à J0 de la souris 24 utilisé comme anticorps primaires"		-		
Témoin cellulaire = cupules n'ayant reçu aucun sérum, uniquement du milieu complet				-

Tableau 5: Représentation des résultats de lecture de fluorescence obtenus sur cellules infectées BTV-8 avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).

Notations :

- : absence de fluorescence, + : fluorescence modérée à faible, ++ : fluorescence importante, NT : sérum de souris non testé

Sur cellules infectées SG33				
	Identifiant de la souris	Dilutions		
		1/50ème	1/100ème	1/200ème
Cage 1 SG33	11	NT	NT	NT
	12	NT	NT	NT
	13	NT	NT	NT
	14	++	++	++
	15	NT	NT	NT
	16	NT	NT	NT
Témoin "anticorps primaires anti-virus myxomateux"		++		
Témoin "anticorps primaires anti-VP2"		-		
Cage 2 BTV-8	21	NT	NT	NT
	22	NT	NT	NT
	23	NT	NT	NT
	24	NT	NT	NT
	25	-	-	-
	26	NT	NT	NT

Tableau 6: Représentation des résultats de lecture de fluorescence obtenus sur cellules infectées SG33 avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).

Notations :

- : absence de fluorescence, ++ : fluorescence importante, NT : sérum de souris non testé

Nous constatons qu'aucune réaction non spécifique n'est observable sur cellules non infectées (*cf. tableau 4*). Le témoin cellulaire nous informe qu'aucune fluorescence non spécifique n'est observable entre anticorps anti-souris couplés FITC et cellules non infectées (*cf. témoin cellulaire négatif*). De même, lors de la mise en contact de sérum de souris vaccinées SG33 ou BTV avec les cellules non infectées, aucune fluorescence n'est détectable.

Sur cellules infectées BTV-8 (*cf. tableau 5*), il n'y a pas de réaction non spécifique entre anticorps anti-souris couplés FITC et cellules infectées BTV puisque le témoin cellulaire est bien négatif.

Nous pouvons constater qu'il y a fluorescence lors de la mise en contact de cellules infectées BTV-8 avec le sérum de souris vaccinées BTV8. Ceci confirme la présence d'anticorps anti-BTV8 produits par ces souris. Bien évidemment, ces anticorps ne sont pas présents dans le sérum de ces souris à J0 (*cf. témoin J0 de la souris 24*).

Comme attendu, aucune fluorescence n'est détectable concernant les sérums des souris vaccinées SG33 mis en contact avec les cellules infectées BTV-8 ce qui témoigne de l'absence d'anticorps anti-BTV8 chez les souris vaccinées SG33.

De même, il a pu être montré que les souris vaccinées SG33 produisent des anticorps anti-virus myxomateux SG33, contrairement aux souris vaccinées BTV-8 (*cf. tableau 6*).

De plus, ce premier test a permis de révéler une dilution optimale au 1/50^{ème} qui sera la concentration utilisée pour le deuxième test d'immunofluorescence.

Deuxième test

Ce test a pour but d'identifier si les souris vaccinées avec les virus recombinants produisent des anticorps anti-VP2 à J51.

Notation : Rappelons que les souris portant les numéros « 3y » ont été vaccinées par VP2-M022, celles portant les numéros « 5y » par VP2-M071 et celles identifiées « 7y » par SG33-VP2.

Sur cellules infectées BTV-8			
	Identifiant de la souris	Dilution au 1/50ème	Témoin: sérum à J0 au 1/50ème
Cage 3 VP2-M022	31	-	NT
	32	+	NT
	33	+	NT
	34	+	- à J0
Cage 5 VP2-M071	51	++	NT
	52	+/-	NT
	53	+/-	+/- à J0
	54	+/-	NT
	55	+/-	NT
Cage 7 SG33-VP2	71	+	NT
	72	+	NT
	73	+	- à J0
	74	+	NT

Témoin positif: anticorps primaires anti-VP2 sur cellules infectées BTV-8	+++
Témoin positif: sérum de la souris 26 sur cellules infectées BTV-8	+++
Témoin négatif: sérum de la souris 16 sur cellules infectées BTV-8	-
Témoin négatif: sérum de la souris 13 sur cellules non infectées	-
Témoin cellulaire: cupules n'ayant reçu aucun sérum, uniquement du milieu complet	-

Tableau 7: Représentation des résultats de lecture de fluorescence sur cellules infectées BTV-8 avec des sérums récoltés à J51 (un seul rappel de vaccination).

Notations :

- : absence de fluorescence, +/- : fluorescence très faible, + : fluorescence modérée à faible, ++ : fluorescence importante, +++ : fluorescence très importante

Les témoins positifs, négatifs et cellulaire sont corrects. Aucune réaction non spécifique n'est décelée entre anticorps FITC et cellules infectées BTV8.

3 souris sur 4 (75%) issues de la cage 3 VP2-M022 semblent présenter un faible taux d'anticorps anti-VP2 car la fluorescence est faible pour 3 d'entre elles. Il en est de même pour toutes les souris de la cage 7 SG33-VP2.

Concernant les souris vaccinées VP2-M071 de la cage 5, la fluorescence est vraiment très faible et identique au témoin à J0. En effet, à J0, une fluorescence faible a été détectée. Il est possible qu'il se produise une réaction non spécifique. Il est donc impossible de conclure sur la présence d'anticorps anti-VP2 dans ce cas. Par contre, la souris 51 se démarque et la fluorescence est marquée, elle présente donc des anticorps anti-VP2.

Ainsi les premiers résultats de ces deux tests sont plutôt encourageants, sachant que le protocole de vaccination est encore incomplet pour toutes ces souris testées à J51.

- D'une part, il semble que les réactions non spécifiques soient plutôt faibles dans tous les cas.

- Les souris témoins vaccinées BTV-8 produisent des anticorps anti-BTV8 alors que les souris vaccinées SG33 produisent des anticorps anti-SG33.
- Les souris vaccinées issues des cages 3 et 7 semblent produire des anticorps anti-VP2 par comparaison à J0. Il est cependant difficile de conclure sur la production d'anticorps anti-BTV8 des souris issues de la cage 5.

Il est donc nécessaire de poursuivre et compléter ces premières observations. Pour cela, toutes les souris ont été testées en immunofluorescence, après avoir reçu les 2 rappels de vaccination (sérums récoltés à Jfinal). De plus, afin de quantifier approximativement les quantités en anticorps et d'utiliser par la suite les quantités les moins consommatrices pour la suite des manipulations, tout en garantissant des lectures aisées, certaines labteks ont été réalisées avec des dilutions successives. Cela nous a permis d'utiliser par la suite des dilutions de travail à partir du 1/100^{ème}.

Tests des sérums après 2 rappels de vaccination

Tous les résultats sont répertoriés dans le *tableau 8*. Il faut savoir que nécessitant beaucoup de matériel et de temps, tous ces tests d'immunofluorescence ont été réalisés en plusieurs fois.

Il n'y a pas de réaction non spécifique entre anticorps anti-souris couplés FITC et cellules infectées BTV-8 ou non infectées BTV-8. De même, aucune réponse non spécifique n'est observable lors de la mise en contact de sérums de souris vaccinées par les recombinants (cages 4, 6 et 8) avec des cellules non infectées BTV-8.

Une fluorescence non spécifique est observable jusqu'à la dilution au 1/100^{ème} pour les souris vaccinées SG33. Au 1/500^{ème}, une seule des souris témoins SG33 présente encore une très faible fluorescence non spécifique.

Une fluorescence non spécifique est observable lors de la mise en contact de certains sérums de souris récoltés à J0 avec des cellules infectées BTV8. Cependant, cette réponse non spécifique peut être considérée comme négligeable car, dans tous les cas testés, la différence est nette entre la fluorescence avec les sérums testés à J0 et Jfinal. De plus, le signal de cette réponse non spécifique s'éteint beaucoup plus rapidement à dilutions successives. Une dilution vers le 1/100^{ème} et le 1/500^{ème} semble permettre de s'affranchir de cette réponse non spécifique. D'autres tests avec des sérums supplémentaires seraient nécessaires pour s'en affranchir entièrement mais étant donné qu'elle est faible et ne perturbe pas grandement l'interprétation des résultats, nous nous sommes contentés de ces résultats. Ainsi, si nous nous plaçons à une dilution au 1/500^{ème}, nous pouvons négliger les réponses non spécifiques.

Sur cellules infectées BTV-8

	Identifiant de la souris	Sérums récoltés à Jfinal						Sérums récoltés à J0				
		Dilutions						Dilutions				
		1/50	1/100	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/50	1/100	1/500	1/1000
Cage 1 SG33	11		++	+								
	12		+	-								
	13	++	+	-								
	14		+	-								
	15		+	-								
	16		+	-								
Cage 2 BTV-8	21											
	22		+++	+++	++							
	23		+++	+++	++							
	24											
	25		+++	+++	++							
	26		+++	++	-	+	-					
Cage 3 VP2-M022	31		++	+	-							
	32		+++	++	+							
	33		+++	++	+							
	34		++	+	+/-							
Cage 4 VP2-M022	41	+++	+++	++	+			+	+	-	-	
	42	++	++	+	-							
	43	++	+	-	-			+				
	44	+++	++	+	-							
	45	++	++	+	-							
Cage 5 VP2-M071	51		+++	+++	++							
	52		++	+	-							
	53		++	+	-							
	54		+	-	-							
	55		+	-	-							
Cage 6 VP2-M071	61	+++	+++	+	-			+				
	62	++	++	++	+							
	63	++	+	-	-			+				
	64	+++	++	+	-							
	65	+++	++	+	-							
Cage 7 SG33-VP2	71		+	-	-							
	72		+++	+	-							
	73		+++	++	+							
	74		+++	++	+							
Cage 8 SG33-VP2	81	+++	+++	++	+			+				
	82	++(+)	+++(+)	+++	+++							
	83	++(+)	+++	++	+			+				
	84	++(+)	++	+	-							
	85	++(+)	++	+	-							

Témoïn positif= AC primaires anti-VP2 ou sérums de souris issues de la cage 2 vaccinées BTV-8 au 1/50ème ou 1/100ème	+++
Témoïn cellulaire: cupules n'ayant reçu aucun sérum, uniquement du milieu complet	-
Témoïn négatif: milieu complet sur cellules non infectées BTV-8	-
Témoïns négatifs: sérums au 1/50ème des souris des cages 4, 6 et 8 testées sur cellules non infectées BTV-8	-
Témoïns J0	cf tableau

Tableau 8: Représentation des résultats de lecture de fluorescence sur des cellules infectées BTV-8 avec des sérums récoltés à Jfinal ou à J0.

Notations :

- : absence de fluorescence, +/- : fluorescence très faible, + : fluorescence modérée à faible, ++ : fluorescence importante, +++ : fluorescence très importante

Nous constatons alors que la plupart des souris vaccinées avec un virus recombinant produisent des anticorps anti-VP2 (cf. tableau 9).

Type de vaccination	Nombre de souris positives à la dilution 1/500ème	Nombre total de souris testées	Pourcentage (en %)
SG33	1	6	16,7
BTV8	4	4	100,0
recombinant VP2-M022	8	9	88,9
recombinant VP2-M071	7	9	77,8
recombinant SG33-VP2	8	9	88,9

Tableau 9: Pourcentages de souris testées présentant une immunofluorescence à la dilution 1/500ème sur cellules infectées BTV-8 (sérum Jfinal) selon leur cage d'origine.

Visuellement, nous avons pu remarquer que l'intensité de l'immunofluorescence paraissait plus forte pour le recombinant SG33-VP2 que pour les deux autres constructions.

Afin d'illustrer les observations rapportées dans les tableaux précédents, des images d'immunofluorescence ont été collectées.

Les clichés suivants sont réalisés au microscope à immunofluorescence à l'aide d'un logiciel de capture (cf. photo 11). Nous pouvons ainsi évaluer les différences d'intensité selon les sérums utilisés. Les différences obtenues ne sont pas franches avec ce logiciel de capture. Les photographies suivantes prises avec un appareil photographique directement par l'objectif montrent des images plus réalistes de ce que nous observions à l'œil nu (cf. photo 12).

Sur tous ces clichés, il est clair que la fluorescence est cytoplasmique. Le noyau des cellules apparaît nettement noir.

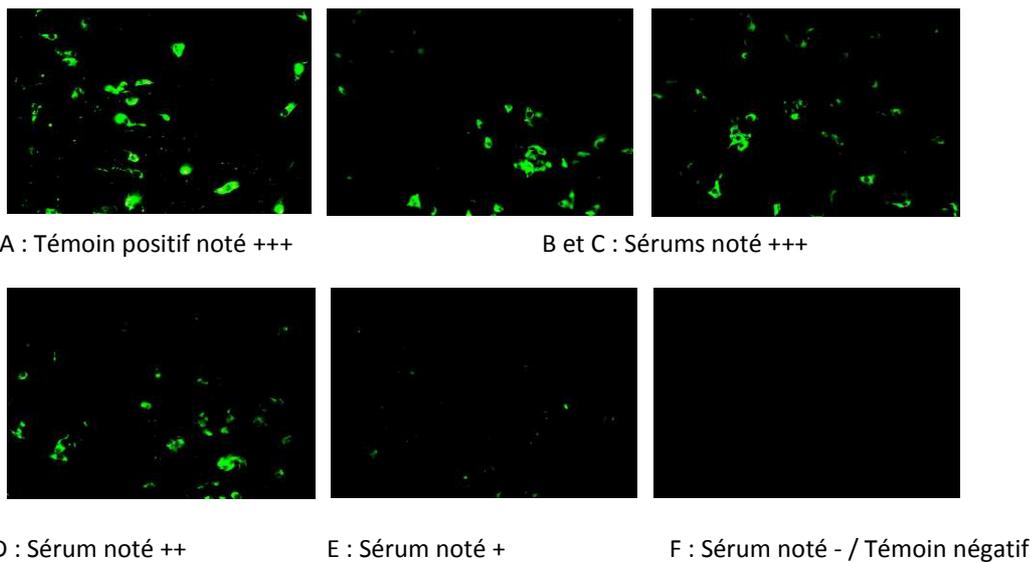


Photo 11: Photographies réalisées par une caméra des différents degrés de fluorescence au microscope à immunofluorescence (x10) selon les sérums utilisés.

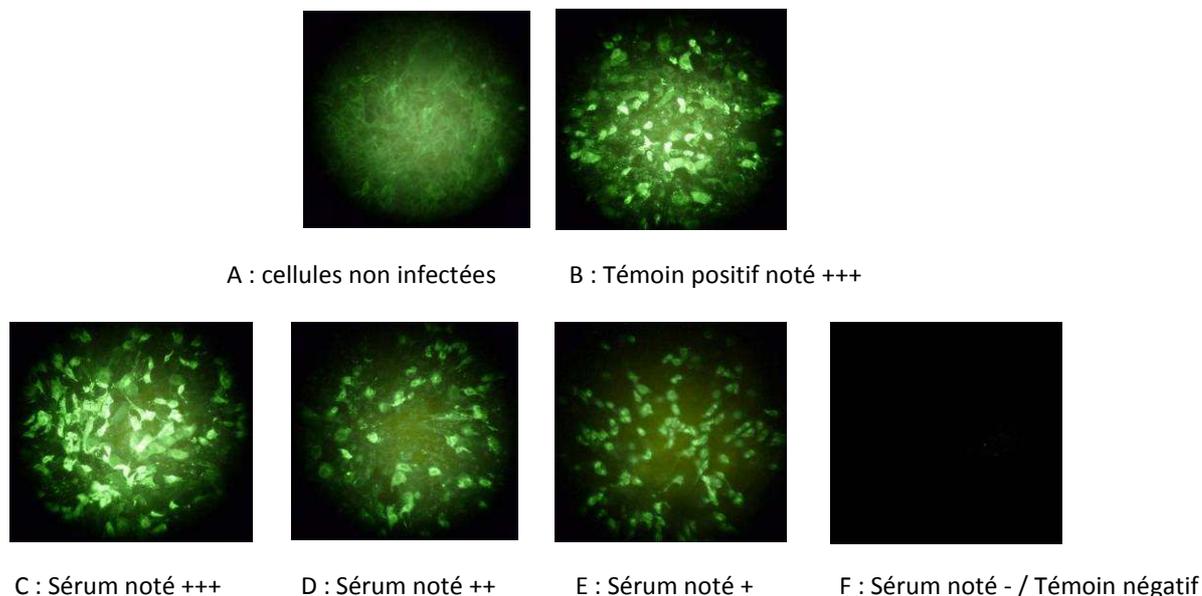


Photo 12: Photographies réalisées par un appareil photographique des différents degrés de fluorescence au microscope à immunofluorescence (x10) selon les sérums utilisés.

Les clichés suivants réalisés au microscope confocal témoignent plus nettement des différences d'immunofluorescence par comparaison aux clichés obtenus par un logiciel de capture au microscope à immunofluorescence (*cf. photo 13*). Nous pouvons ainsi nettement évaluer les différences d'intensité selon les sérums utilisés.

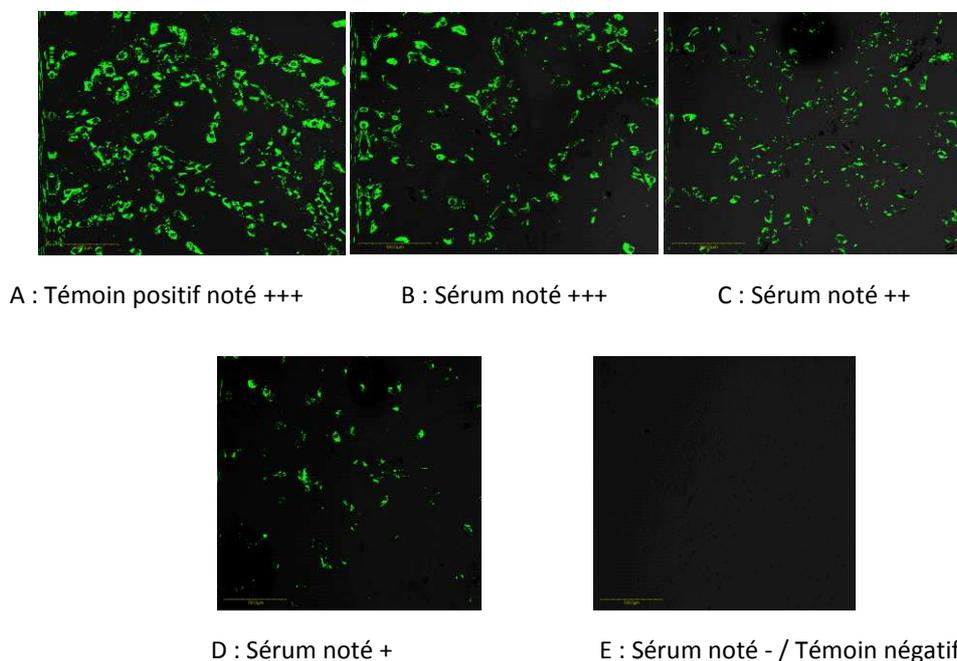


Photo 13: Photographies réalisées au microscope confocal des différents degrés de fluorescence selon les sérums utilisés.

Des séroneutralisations ont été réalisées sur cellules Vero. Les anticorps anti-VP2 mis en évidence ne sont pas neutralisants sauf pour une seule souris (souris 25) ayant été vaccinée par du BTV8. La neutralisation observée était très faible.

Vaccination	Numéro de souris	ECP
SG33	14	+
	16	+
BTV-8	24	+
	25	- jusqu'à 1/16
VP2-M022	32	+
	33	+
	41	+
	44	+
VP2-M071	51	+
	61	+
	62	+
	65	+
SG33-VP2	72	+
	73	+
	82	+
	85	+

Tableau 10 : Résultats des séroneutralisations.

ECP : Effet cytopathogène

3.2. Analyse de la réponse cellulaire

3.2.1. Marquage intracellulaire

Les splénocytes de toutes les souris ont été analysés en cytométrie de flux après marquage intracellulaire (*cf. figure 20*).

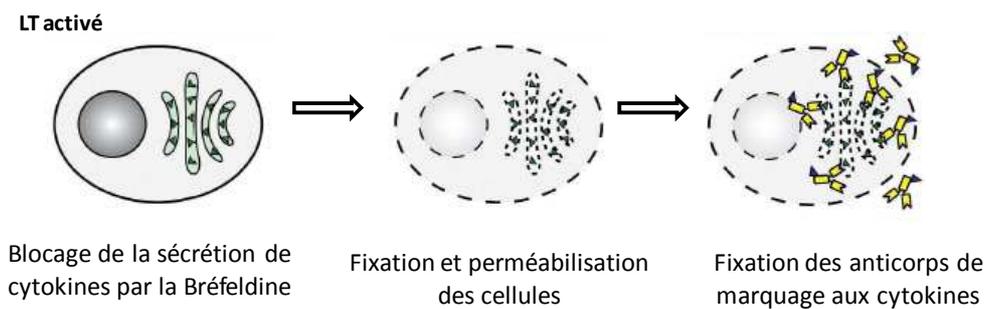


Figure 20: Principe du marquage intracellulaire

Malheureusement, une perte très importante en cellules des souris de la première série n'a pas rendue exploitable ces données. L'origine n'a pas été identifiée. Seule la deuxième série de souris a permis d'obtenir des résultats.

Quelques contrôles de splénocytes purifiés mis en contact avec du PMA-Ionomycine ont été réalisés et ont servi de témoin positif. Le marquage est assez décevant car les cellules activées produisant des IFN γ (environ 10% de CD3 $^{+}$ -IFN $^{+}$), des IL-2 (environ 6% de CD3 $^{+}$ -

IL2+) sont à des proportions faibles par rapport aux valeurs attendues avec ce type de stimulation.

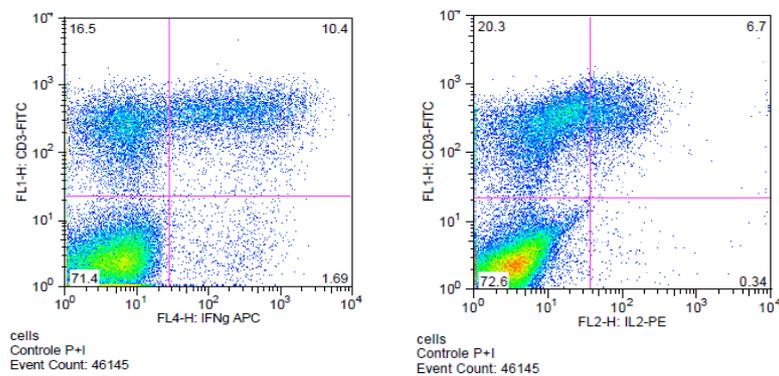
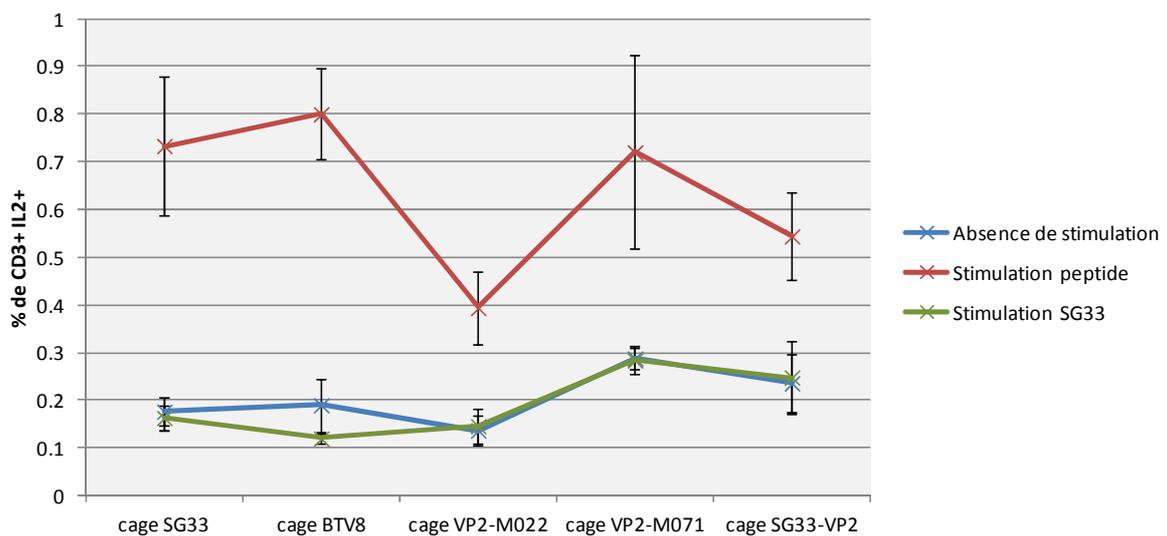


Figure 21: Marquage intracellulaire IFN gamma et IL-2 pour les souris témoins négatifs stimulées PMA-Ionomycine.

Les analyses statistiques qui suivent ont fait appel à des analyses de variance et des tests de Student avec correction de Bonferroni.

a. CD3+/-IL2+

Selon l'ANOVA, l'interaction stimulation et vaccination est significative ($p=1.381.10^{-4}$). Les effets stimulations ($p< 2.2.10^{-16}$) et vaccinations ($p=1.173.10^{-6}$) sont significatifs.



Graphique 1: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IL-2 selon l'origine des souris et le type de stimulation.

Nous pouvons constater que l'effet peptide est plus marqué pour les souris dans chacune des cages. En effet, le nombre de cellules CD3+ IL2+ est plus élevé lorsque les cellules sont stimulées avec le peptide, quelque soit la vaccination utilisée au préalable. Cependant, nous pouvons constater que cette réaction est non spécifique. Les cellules issues de souris

vaccinées SG33 produisent autant d'IL2 que les cellules de souris vaccinées BTV lorsqu'elles sont stimulées avec le peptide ($p=0,33$). Nous pouvons également remarquer que les souris vaccinées VP2-M022 ont une moyenne significativement plus basse que le lot témoin de la cage SG33, lorsqu'elles sont activées par le peptide ($p= 1,4.10^{-6}$). Cette réponse non spécifique pourrait être à l'origine de cette observation plutôt surprenante. Il n'est pas possible de conclure avec cette expérience quant à l'induction de LT CD3+ producteurs d'IL-2 spécifiques de VP2.

Nous retrouvons cette réaction non spécifique sur les profils obtenus au logiciel FlowJo, concernant toutes les cellules stimulées avec le pool de peptides (*cf. figure 22*).

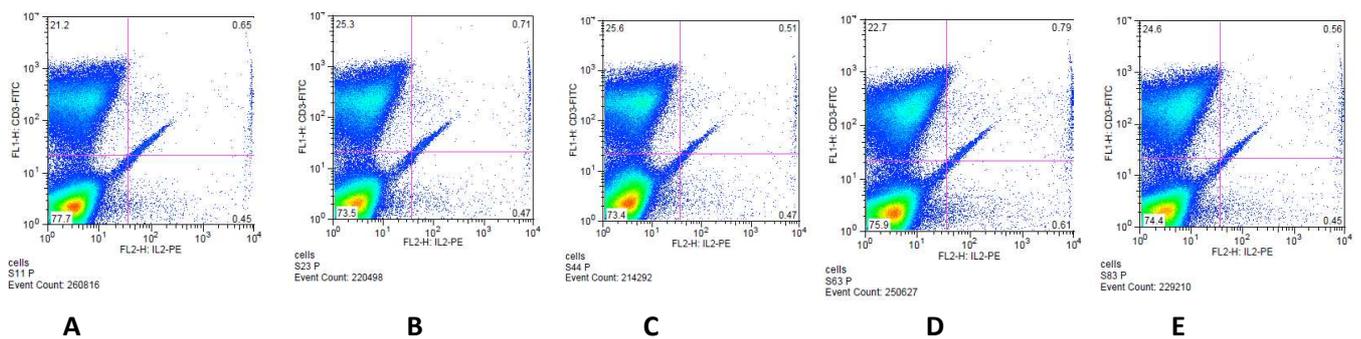


Figure 22: Marquage intracellulaire IL-2 des cellules stimulées par le pool de peptides VP2 selon l'origine de la souris.

Cellules stimulées par le pool de peptides VP2 pour les souris témoins négatifs vaccinées SG33 (figure A), pour les souris témoins positifs vaccinées BTV-8 (figure B), pour les souris vaccinées VP2-M022 (figure C), pour les souris vaccinées VP2-M071 (figure D) et pour les souris SG33-VP2 (figure E).

Dans tous les cas, dans chaque cage, les moyennes après stimulation SG33 ou sans stimulation sont homogènes (différences non significatives). Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence une induction de cellules CD3+ spécifiques productrices d'IL-2 par le vecteur SG33.

Afin de s'affranchir de cette réponse non spécifique lors de la stimulation avec le peptide, nous avons tenté d'optimiser les résultats en améliorant la sélection cellulaire (*cf. figure 23*). Cette sélection a été appliquée à tous les échantillons quelque soit la stimulation. Nous avons alors obtenu les résultats qui suivent.

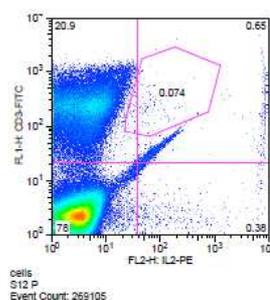
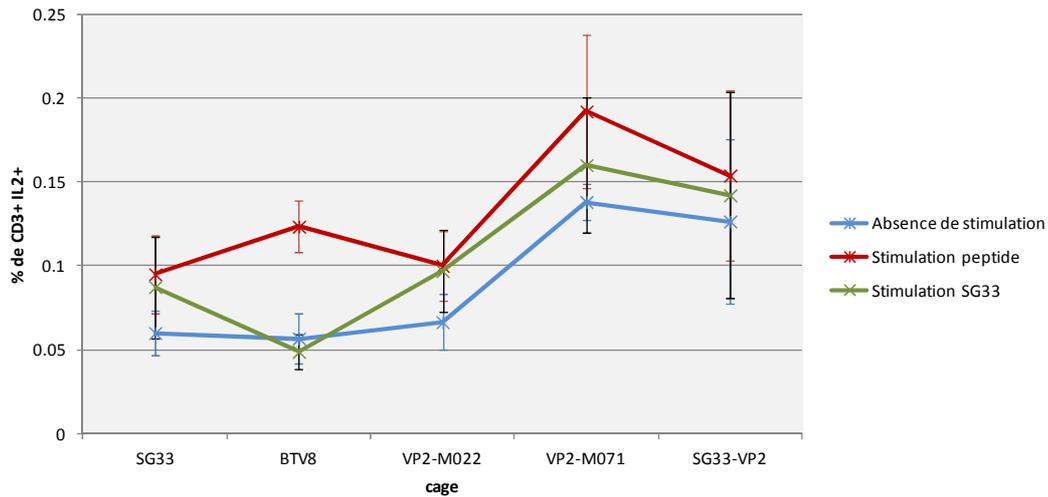


Figure 23: Marquage intracellulaire IL-2 et fenêtre de sélection pour s'affranchir de la réponse non spécifique.



Graphique 2: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IL-2 selon l'origine des souris et le type de stimulation, après sélection ciblée en vue de s'affranchir d'une réponse non spécifique avec les peptides VP2.

Selon l'ANOVA, l'interaction stimulation et vaccination n'est pas significative ($p=0,749$). Les effets stimulations et vaccinations sont donc indépendants dans le cas présent et seuls les effets simples peuvent être interprétés. Les effets stimulations ($p=1,617.10^{-3}$) et vaccinations ($p=2.218.10^{-8}$) sont quant à eux significatifs.

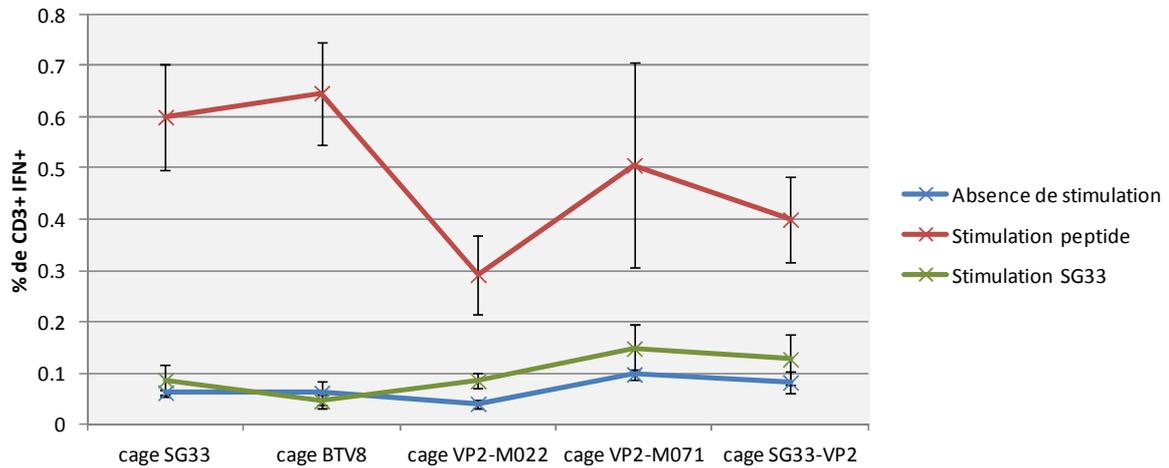
D'après ces résultats de test ANOVA, nous pouvons conclure qu'au moins deux stimulations ont des effets différents. En effet, nous pouvons constater que la stimulation peptide à un effet plus important sur la sécrétion d'IL2 par rapport à la stimulation SG33 ($p=0,041$) et à l'absence de stimulation ($p=3,67.10^{-4}$). Par contre, les effets de stimulation SG33 ou d'absence de stimulation sont similaires ($p=0,089$). Ainsi, l'effet peptide sur la sécrétion d'IL2 est le plus important, de la même façon pour toutes les cages. Là encore, cela témoigne d'une réaction non spécifique avec les peptides utilisés. Il est explicite que nous ne sommes pas parvenus à s'affranchir de cette dernière.

Ce test ANOVA indique également qu'au moins deux vaccinations, indépendamment de la stimulation, ont des effets différents. En effet, l'effet vaccination par du VP2-M071 induit une augmentation de CD3+ IL2+, indépendamment de toute stimulation, par rapport à la vaccination par BTV par exemple ($p=4,55.10^{-7}$) ou VP2-M022 ($p=4,32.10^{-7}$). Le taux de CD3+ IL2 basal lors de la vaccination par VP2-M071 est plus fort que les autres.

Ceci ne modifie en rien l'interprétation à propos de l'immunogénicité de VP2 ou du vecteur dans notre cas. Cette différence basale n'était pas significativement détectable dans le cas précédent.

b. CD3+ IFN γ +

Selon l'ANOVA, l'interaction stimulation et vaccination est significative ($p=1.309.10^{-4}$). Les effets stimulations ($p< 2.2.10^{-16}$) et vaccinations ($p=9.474.10^{-4}$) sont significatifs.



Graphique 3: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IFN gamma selon l'origine de la souris et le type de stimulation.

De même que la situation précédente, nous pouvons constater que l'effet peptide est plus marqué pour les souris dans chacune des cages. En effet, le nombre de cellules CD3+ IFN+ est plus élevé lorsque les cellules sont stimulées avec le peptide, quelque soit la vaccination utilisée au préalable. Cependant, nous pouvons constater que cette réaction est non spécifique. Les cellules issues de souris vaccinées SG33 produisent autant d'IFN que les cellules de souris vaccinées BTV lorsqu'elles sont stimulées avec le peptide ($p=0,46$).

Nous pouvons également remarquer que les souris vaccinées VP2-M022 ou SG33-VP2 ont des moyennes significativement plus basses que le lot témoin de la cage SG33, lors de la stimulation avec le peptide (respectivement $p=1,37.10^{-6}$ et $p=7,97.10^{-4}$). Cette réponse non spécifique pourrait être à l'origine de cette observation plutôt surprenante. Les lots de souris vaccinées VP2-M022, VP2-M071 et SG33-VP2 ne présentent pas de différence significative entre eux lorsqu'ils sont stimulés par le peptide.

Il n'est pas possible de conclure avec cette expérience quant à l'induction de LT CD3+ producteurs d'IFN gamma spécifiques de VP2.

Comme évoqué dans le cas de la production d'IL-2, nous retrouvons cette réaction non spécifique sur les profils obtenus au logiciel FlowJo, concernant toutes les cellules stimulées avec le pool de peptides (*cf. figure 24*).

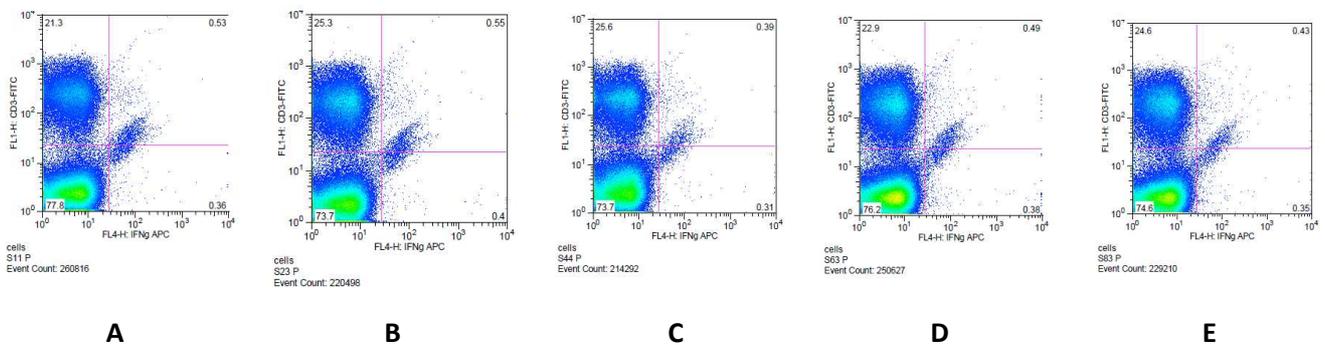


Figure 24: Marquage intracellulaire IFN gamma des cellules stimulées par le pool de peptides VP2 selon l'origine de la souris.

Cellules stimulées par le pool de peptides VP2 pour les souris témoins négatifs vaccinées SG33 (figure A), pour les souris témoins positifs vaccinées BTV-8 (figure B), pour les souris vaccinées VP2-M022 (figure C), pour les souris vaccinées VP2-M071 (figure D) et pour les souris SG33-VP2 (figure E).

Dans chaque cage, les moyennes après stimulation SG33 ou sans stimulation sont homogènes (différences non significatives). Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence une induction de cellules CD3+ spécifiques productrices d'IFN γ par le vecteur SG33.

Afin de s'affranchir de cette réponse non spécifique lors de la stimulation avec le peptide, nous avons tenté d'optimiser les résultats en améliorant la sélection cellulaire (*cf. figure 25*). Cette sélection a été appliquée à tous les échantillons quelque soit la stimulation. Nous avons alors obtenu les résultats qui suivent.

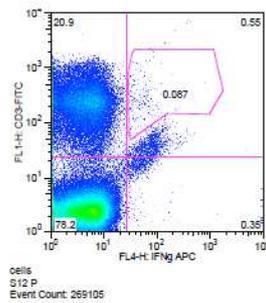
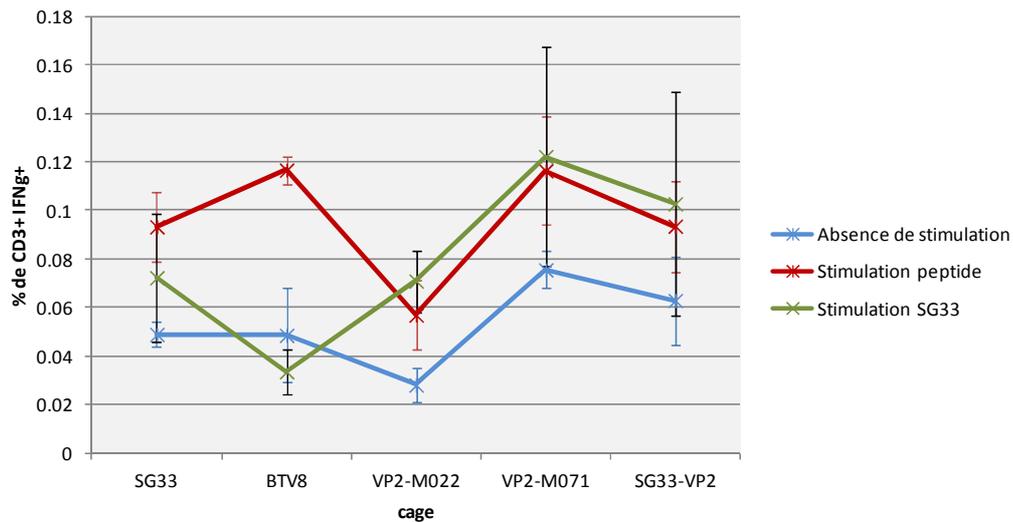


Figure 25: Marquage intracellulaire IFN γ et fenêtre de sélection pour s'affranchir de la réponse non spécifique.



Graphique 4: Pourcentage de cellules CD3+ activées produisant des IFN γ selon l'origine des souris et le type de stimulation, après sélection ciblée en vue de s'affranchir d'une réponse non spécifique avec les peptides VP2.

Selon l'ANOVA, l'interaction stimulation et vaccination est significative ($p=1,781.10^{-2}$). Les effets stimulations ($p=2.416.10^{-6}$) et vaccinations ($p=2.694.10^{-6}$) sont significatifs.

Nous pouvons constater que l'effet peptide, pour chacune des cages, est moins important après avoir réadapté la sélection cellulaire. Toutefois, nous ne pouvons toujours pas conclure quant à l'immunogénicité de VP2. En effet, il semble qu'une réaction non spécifique demeure et un argument majeur en témoigne. La moyenne pour les cellules issues de souris immunisées SG33 et stimulées par le peptide est significativement plus haute que celles issues de cette même cage mais non stimulées ($p=0,0244$).

A propos des deux cages témoins SG33 et BTV, aucune différence significative n'est mise en évidence pour les cellules issues de souris vaccinées BTV ou SG33 et stimulées par les peptides ($p=0,227$).

De surcroît, un résultat surprenant apparaît concernant les cellules issues de souris vaccinées VP2-M022 stimulées par les peptides. La moyenne est significativement plus basse que le témoin négatif (souris vaccinées SG33 et stimulées par le peptide) ($p=0,038$). Cette observation ne semble pas due à un niveau basal différent entre les deux catégories puisque les moyennes, en l'absence de stimulation, entre les groupes VP2-M022 et SG33 ne sont pas significativement différentes ($p=0,229$).

Pour chacune des cages, le témoin non stimulé est significativement plus bas que les deux autres stimulations, sauf dans le cas de la cage VP2-M022 où aucune différence significative avec la stimulation peptide n'est mise en évidence ($p=0,057$). Par contre, nous pouvons remarquer que le niveau basal en CD3+ IFN γ + sans stimulation peut être différent d'une cage à l'autre. Ceci est par exemple le cas entre les cages VP2-M022 et VP2-M071 ($p=2,39 \cdot 10^{-3}$). Cette observation doit être prise en compte pour certaines interprétations.

Concernant la stimulation SG33, la moyenne des cellules des souris immunisées BTV est significativement plus basse ($p=0,048$) que celle des cellules des souris de la cage SG33. Les vecteurs des recombinants semblent induire une réponse spécifique car les moyennes avec le témoin négatif (cage BTV) sont significativement différentes ($p=0,0336$, $p=4,27 \cdot 10^{-6}$ et $p=1,86 \cdot 10^{-4}$). Cependant, même si aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le niveau basal en cellules CD3+ IFN γ + entre les groupes BTV et VP2-M022, VP2-M071, SG33-VP2 en l'absence de stimulation (respectivement $p=0,12$, $p=0,23$ et $p=0,40$), cette nuance peut être conservée en vue d'expliquer le résultat précédent.

→ Ainsi, nous pouvons retenir que cette expérience ne permet pas la mise en évidence d'une induction de cellules spécifiques CD3+ productrices d'IFN γ ou d'IL2 par VP2. Une probable réponse spécifique avec induction de cellules CD3+ IFN γ + spécifiques au vecteur a été mise en évidence.

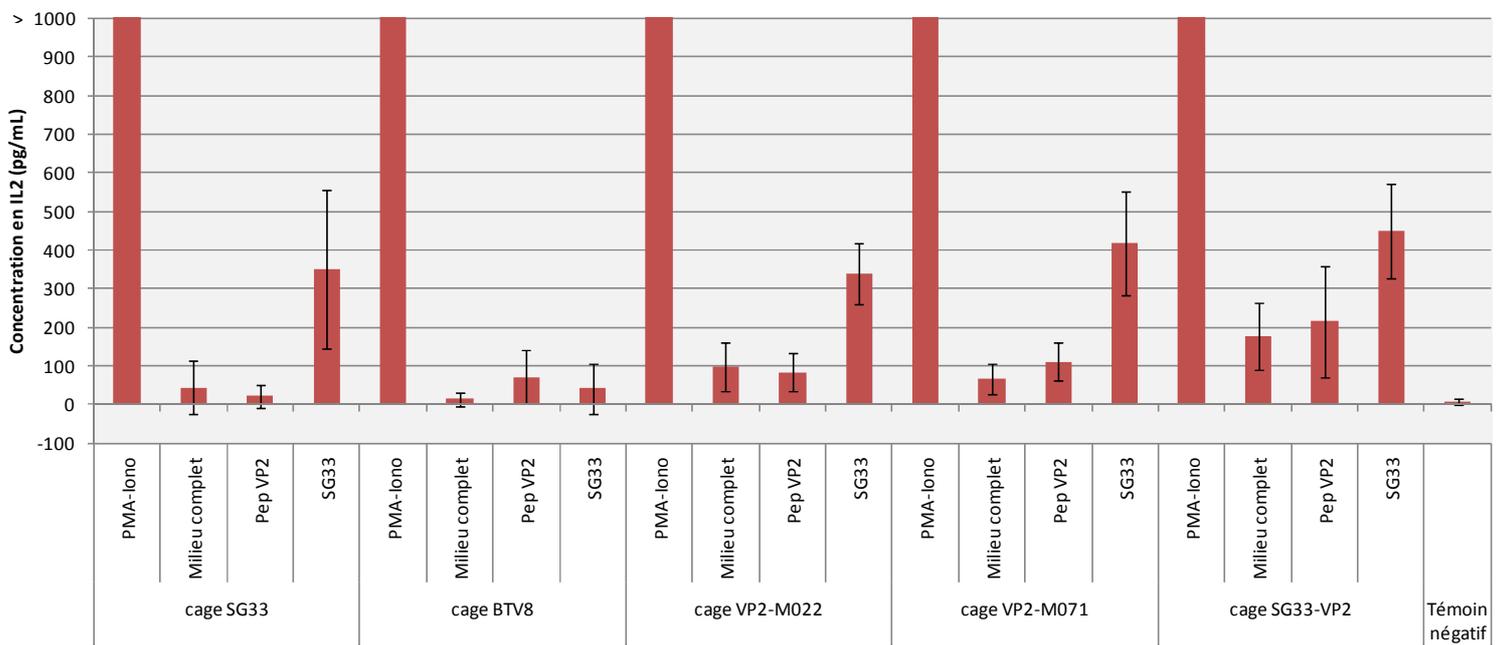
3.2.2. Test ELISA

Nous avons dosé les cytokines IL-2 à partir du kit Duoset Mouse IL-2 de R&D Systems. Comme indiqué sur la notice, les calculs des concentrations en IL2 des échantillons ont été réalisés grâce à une modélisation établissant une courbe logistique à 4 paramètres à partir de la gamme standard fournie dans le kit [logiciel élaboré par Hitachi Solutions, 2012].

Comme attendu (*cf. graphique 5*), nous pouvons constater que le PMA-Ionomycine stimule correctement les splénocytes.

Concernant la stimulation VP2, nous pouvons constater qu'il n'y a aucune différence significative avec la stimulation au milieu complet pour toutes les souris. Ceci est également valable pour les souris vaccinées BTV8 ($p=0,22$) ce qui témoigne d'un défaut de stimulation par les peptides VP2.

Ce dosage de cytokines nous permet de mettre en évidence une production d'IL-2 suite à l'immunisation par le vecteur SG33.



Graphique 5: Production d'IL-2 par les splénocytes selon leur stimulation et la vaccination des souris dont ils sont issus.

3.2.3. CFSE

Après incorporation de CFSE, les splénocytes sont incubés cinq jours avec différents activateurs. Le marqueur CFSE permet de mettre en évidence les divisions cellulaires, ce qui traduit l'activation des cellules (cf. figure 26).

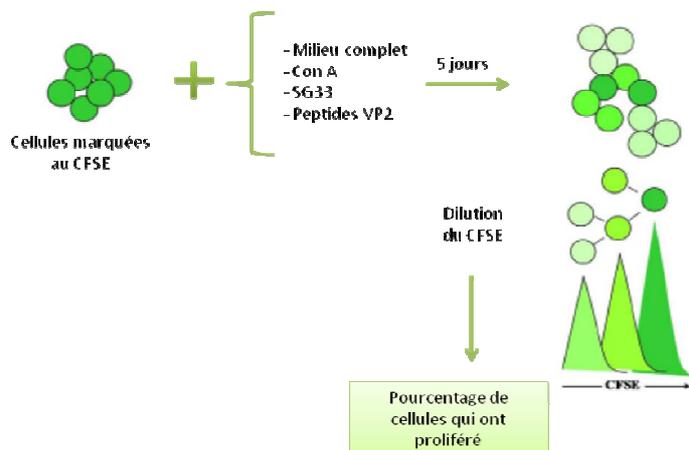
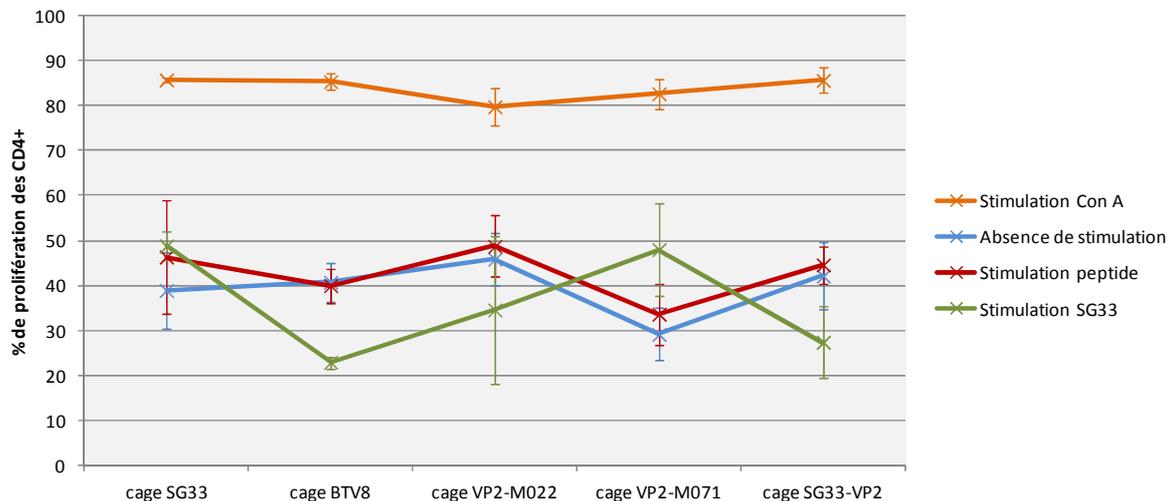


Figure 26: Principe du CFSE.

Nous nous sommes intéressés uniquement aux cellules CD4 positives, sachant que nous nous intéressons aux cellules CD3 positives grâce au marquage intracellulaire.

Malheureusement, les cellules de la première série de souris étaient toutes mortes. Ainsi, aucun résultat concernant la réponse cellulaire de ce lot de souris n'est interprétable. L'origine n'a pas été identifiée. Seule la deuxième série de souris a permis d'obtenir des résultats. Il faut tout de même tenir compte qu'aucun marqueur de viabilité cellulaire n'a été réalisé lors de cette deuxième série de souris.



Graphique 6: Pourcentage de prolifération des cellules CD4+ selon la vaccination des souris et la stimulation de leurs splénocytes.

Nous pouvons constater (*cf. graphique 6*) que la stimulation con A induit une division cellulaire significative des lymphocytes CD4 + puisque nous observons un pourcentage de prolifération des CD4+ d'environ 85%, quelque soit la cage. Il s'agit du témoin positif. Les cellules non activées c'est-à-dire mises en contact avec du milieu complet constituent le témoin négatif.

Pour une même cage, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative entre les cellules activées avec les peptides et les cellules non activées (témoin négatif). Par contre, concernant les souris issues de la cage BTV8, le pourcentage de prolifération suite à l'activateur SG33 est bien plus faible significativement (environ 20%) par rapport aux cellules activées par les peptides ou non activées (environ 40%) (respectivement $p=1,88.10^{-3}$ et $2,39.10^{-3}$). Ce résultat est surprenant étant donné qu'avec l'activateur SG33, la prolifération est deux fois plus faible que le témoin négatif (absence de stimulation). Il en est de même concernant la cage de souris vaccinées SG33-VP2 ($p=0,016$). Ainsi, les résultats de cette expérience apparaissent peu interprétables.

Il est impossible avec cette expérience de conclure que le vecteur SG33 ou la protéine VP2 induisent une lymphoprolifération de cellules CD4 positives.

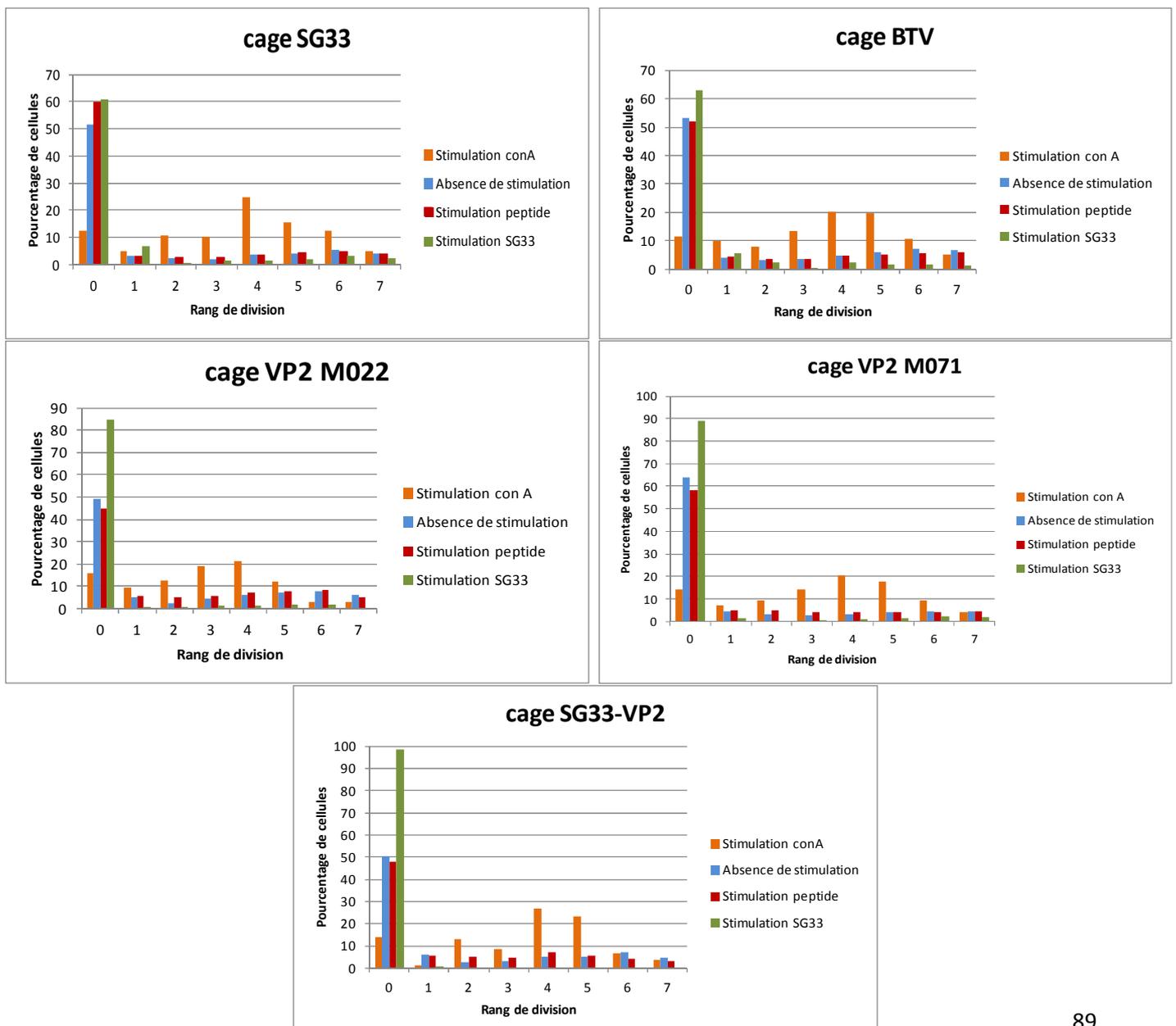
Ce défaut d'interprétation peut être expliqué en grande partie en s'intéressant aux données brutes. A partir de ces dernières, il est aisé de constater que le nombre de cellules, pour la plupart des échantillons issues de stimulation SG33, est trop faible comparativement aux

autres échantillons (de 2 à 10 fois plus faible comparativement). Ainsi, si nous considérons que les autres échantillons ont des cellules en nombre suffisant (aux alentours de 1000 dans notre cas), les courbes « absence de stimulation », « stimulation peptide » et « stimulation con A » restent interprétables.

Si nous nous intéressons à présent aux différentes générations de cellules CD4+ (cf. graphiques 7), nous pouvons constater que la prolifération est tout à fait comparable, pour chaque cage de souris, entre les cellules stimulées par les peptides et non stimulées. Cela confirme que VP2 ne semble pas induire de lymphoprolifération ou un défaut de stimulation par les peptides VP2.

Concernant les cellules stimulées avec de la Con A, la population cellulaire la plus importante est celle qui a réalisé 4 divisions. Ceci est observable pour toutes les cages.

Nous n'évoquerons pas la prolifération concernant la stimulation SG33 pour les raisons évoquées précédemment rendant ces résultats non interprétables.



Graphique 7: Profils de division par marquage CFSE des lymphocytes CD4+ selon la vaccination des souris et la stimulation de leurs splénocytes

DISCUSSION

Comme nous l'avons évoqué longuement dans ce travail, les poxvirus sont capables d'intégrer des génomes étrangers et il a déjà été démontré que le virus myxomateux est capable d'exprimer sur son enveloppe une protéine d'intérêt en fusion [Bertagnoli *et al.*, 2011]. L'étude présentée dans ce travail s'inscrit dans la poursuite de l'amélioration d'un vecteur vaccinal recombinant utilisant la technique classique d'expression d'un antigène. En effet, un vaccin recombinant permettant de lutter contre la fièvre catarrhale ovine a été élaboré par l'équipe UMR1225 INRA-ENVT en se basant sur une technique de construction classique. Ce vaccin utilisant la souche SG33 du virus myxomateux et l'antigène VP2 du virus de la fièvre catarrhale ovine a permis de conférer une protection homologue à des moutons. Cependant, même s'il a montré son efficacité face à une épreuve virulente, il demeure moins efficace que le vaccin inactivé actuellement sur le marché [Top *et al.*, 2012]. Il a donc paru intéressant de poursuivre ces investigations en tentant d'améliorer l'immunogénicité de ce vecteur. Ce nouveau vaccin pourrait s'inscrire dans la stratégie DIVA contrairement au vaccin déjà commercialisé. De nombreuses études basées sur la stratégie consistant à faire exprimer une protéine chimère antigénique sur la particule virale, que ce soit en utilisant les poxvirus ou d'autres familles de vecteurs, se sont révélées être un succès pour l'amélioration de l'immunogénicité. Ainsi, nous avons utilisé cette technique à partir de la souche SG33 du virus myxomateux et de la protéine VP2 du BTV-8. Il a également été confirmé à travers l'étude de Top et collaborateurs [Top *et al.*, 2012] que la protéine VP2 seule, étant à l'origine de la synthèse d'anticorps neutralisants, est suffisante pour induire une protection sur moutons. Son utilisation a donc été poursuivie. Deux virus recombinants ont alors été créés (précédemment au travail exposé dans cette thèse) et ont été testés sur souris afin d'évaluer leur immunogénicité et leur innocuité. Si les résultats s'avéraient intéressants, il serait alors envisagé par la suite de les tester sur moutons, espèce cible du BTV. Cependant, il est net dans notre étude que les résultats obtenus ne sont pas à la hauteur de nos espérances et des études supplémentaires seront nécessaires.

Cette étude dans un modèle murin a pu confirmer la synthèse en anticorps anti-VP2 avec les deux virus recombinants en fusion. Des études supplémentaires de séroneutralisation ont montré que ces anticorps produits suite à la vaccination avec les recombinants en fusion ne sont pas neutralisants, ni même ceux obtenus par immunisation avec la construction classique SG33-VP2. Pourtant, dans l'étude de Top et ses collaborateurs [Top *et al.*, 2012], la construction classique induit des anticorps neutralisants chez les ovins, ce qui n'est pas le cas chez les souris dans notre étude. Par ailleurs, sur deux souris testées en séroneutralisation qui étaient immunisées par du BTV-8, une seule a produit des anticorps neutralisants, et en faible quantité (titre de 1/16). Ceci amène à nous interroger sur l'utilisation d'un modèle murin dans notre cas.

En effet, Lobato et collaborateurs ont par exemple [Lobato *et al.*, 1997] montré, en utilisant un vecteur vaccine exprimant VP2, que la production d'anticorps anti-VP2 était très faible voire nulle chez les lapins. Dans la même étude, ce n'était pas le même cas chez les ovins où cette immunisation induisait des anticorps anti-VP2 neutralisants. De même, la

construction classique SG33-VP2 n'a pas entraîné la synthèse d'anticorps neutralisants chez le lapin contrairement à ce qui a été observé chez l'espèce ovine [Bertagnoli S., communication personnelle]. Il est donc tout à fait justifié de se demander si le modèle murin est un reflet de ce qui se produirait *in vivo* chez des ovins étant donné qu'entre deux espèces, cette immunogénicité peut varier. Il a déjà été prouvé qu'il était possible d'induire la synthèse d'anticorps neutralisants anti-VP2 chez les souris [Inumaru et Roy, 1987] mais aucune étude s'intéressant à la production en anticorps suite à une immunisation par VP2 à la fois chez des souris et des ovins n'a, à ma connaissance, été publiée. Ceci aurait permis de comparer si l'immunogénicité de VP2 est la même chez ces deux espèces.

L'induction d'anticorps anti-VP2, certes non neutralisants, confirme tout de même une fois de plus que le vecteur myxomateux est apte à présenter des antigènes en fusion.

Toutefois, d'après les tests d'immunofluorescence, nous pouvons constater que la réponse humorale semble plus importante dans le cas d'une construction classique SG33-VP2 par rapport aux constructions en fusion (*cf. tableau 8, dilution 1/500*). Ainsi, cela signe un défaut d'immunogénicité de nos virus recombinants en fusion par rapport à la construction classique. Ces résultats sont subjectifs et fournis par observation au microscope à fluorescence. Un test ELISA anti-VP2 pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer cette observation par quantification de ces anticorps mais aucun fournissant des résultats convenables n'est disponible actuellement sur le marché.

Concernant la réponse cellulaire, il n'a pas pu être montré que VP2, quelque soit la vaccination utilisée, induisait une réponse cellulaire spécifique en modèle murin. Avant tout, un problème important réside dans le fait qu'une perte de cellules importante s'est produite lors de la première série de souris en marquage intracellulaire et CFSE. Concernant le CFSE, aucun marqueur de viabilité cellulaire n'a été réalisé pour la deuxième série de souris en CFSE. Il s'agit d'un problème d'autant plus réel que, lors de la première série de souris, il s'est révélé une importante mortalité. La prolifération témoin avec du Con A est bonne, aux alentours de 80% ce qui indique tout de même une bonne viabilité cellulaire. La perte importante de cellules ou la mort cellulaire lors de la première série de souris peut s'expliquer par un défaut d'optimisation du protocole. Ce dernier multipliant les manipulations et les intervenants est lourd pour un tel nombre de souris. Ainsi, la première série de souris était associée à la découverte du protocole. Sa réalisation pour la deuxième série de souris s'était affranchie de cette étape de découverte, ce qui peut expliquer les meilleurs résultats.

Cependant, avec les données de la deuxième série de souris, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'induction par VP2 de LT spécifiques produisant des IL-2 ou des IFN γ . Une réponse non spécifique importante avec le pool de peptides VP2 a gêné l'interprétation des marquages intracellulaires. De plus, les contrôles réalisés à partir d'une stimulation avec du PMA-Ionomycine confirment que quelques cellules sont activées et produisent des IL2 et des IFN γ mais leur nombre est faible par rapport aux valeurs de référence souhaitées. D'après le test CFSE de la deuxième série, il semblerait qu'aucun des virus recombinants n'induit une lymphoprolifération de LT CD4+.

Tout comme dans le cas de l'évaluation de la réponse humorale, il est possible de s'interroger sur la validité du modèle murin dans le cadre de l'évaluation de la réponse cellulaire spécifique. En effet, d'importantes variations entre espèces voire entre individus dans une même espèce concernant la reconnaissance de protéines du BTV par les LTc existent [Schwartz-Cornil *et al.*, 2008]. Chez les souris, les principales sources de reconnaissance des LTc sont les protéines non structurales, suivies de VP3 puis VP7, VP2 et VP5. Chez les ovins, les protéines immunogènes pour les LTc sont VP2 et NS1. Ainsi, il est probable que VP2 soit, de nature, peu immunogène dans le modèle murin.

Le fait d'utiliser un modèle murin présente incontestablement de gros avantages d'où son utilisation dans cette étude. Il réduit considérablement le coût des recherches. Il permet également de s'affranchir des contraintes techniques et logistiques inhérentes aux infections expérimentales sur ovins. Un nouveau modèle murin pouvant faciliter les études sur la bluetongue a été élaboré récemment [Calvo-Pinilla *et al.*, 2009]. En effet, des souris adultes déficientes en récepteur d'IFN de type 1 (IFNAR^(-/-)) sont sensibles au BTV-4 et BTV-8 quand il est administré en intraveineux (apathie, écoulements oculaires, mort dans les 60h post-inoculation). Dans cette même étude, l'immunisation de souris avec un vaccin inactivé contre le BTV4 a montré une induction d'anticorps neutralisants et une totale protection. Un essai a été réalisé sur ces souris [Franceschi *et al.*, 2011] ayant subi une inoculation intrapéritonéale d'un vecteur herpesvirus bovin de type 4 exprimant VP2. Elles ont alors présenté des anticorps anti-BTV neutralisants et un temps de survie plus long que des souris non immunisées après épreuve avec du BTV-8. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir réaliser un test d'épreuve chez cette espèce contrairement aux souris utilisées dans notre essai. Cependant, il n'est pas possible de prévoir l'effet du vecteur SG33 chez ces souris déficientes en récepteur IFN et il serait nécessaire d'évaluer cet effet dans un premier temps avant de tester les recombinants sur ces dernières.

Pour tenter d'expliquer le défaut d'immunogénicité de VP2 chez les souris, nous pouvons également émettre d'autres hypothèses.

- Nous pouvons penser que l'antigène VP2 n'est pas suffisamment exprimé par les recombinants *in vivo* chez les souris. Il est difficile de prévoir la conformation des protéines fusionnées et nous ne pouvons exclure l'hypothèse que celle de VP2 soit modifiée dans nos constructions. Or, VP2 comporte deux domaines hydrophiles contenant de multiples épitopes conformationnels impliqués dans la neutralisation du virus [DeMaula *et al.*, 2000 ; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008]. L'architecture tridimensionnelle des protéines VP2 en fusion ou en présentation classique ne permet peut-être pas une présentation de l'antigène suffisante aux cellules immunitaires. Ceci pourrait expliquer que la production d'anticorps anti-VP2 soit plus faible pour les recombinants en fusion, leur caractère non neutralisant pour toutes nos constructions chez les souris et l'absence de LT spécifiques.

Nos différents vaccins ont été testés *in vitro* sur cellules RK13 (cellules rénales de lapin). Les gènes VP2 étaient correctement exprimés sur cellules infectées. Il aurait été intéressant de vérifier par marquage immunologique sur virions si les protéines de fusion étaient

correctement incorporées dans ces derniers afin de s'assurer que l'antigène est correctement présenté par les virions.

- Nous avons pu constater d'après les tests d'immunofluorescence que l'immunogénicité des recombinants en fusion semble plus faible que celle de la construction classique. Les promoteurs utilisés ne sont pas les mêmes selon les constructions. Le promoteur p7,5 utilisé pour la construction classique SG33-VP2 est un promoteur fort précoce-tardif contrairement aux promoteurs M022L et M071L qui sont des promoteurs tardifs. Le vecteur est non répliquatif chez les souris et nous pouvons donc penser que les promoteurs précoces ou mixtes sont plus intéressants chez les souris, les protéines tardives ayant moins de chance d'être exposées de manière directe par les cellules murines infectées [Drillien *et al.*, 2003]. La transcription des gènes précoces est autonome puisque les facteurs de transcription nécessaires sont encapsidés dans le virion et la machinerie cellulaire de traduction est ubiquitaire dans les cellules de mammifères.

- Enfin, nous avons pu confirmer que la stimulation avec les peptides VP2 n'est pas efficace. En effet, le dosage des cytokines montre que la stimulation par les peptides VP2 n'induit pas une augmentation en IL2 chez des souris vaccinées BTV8. La qualité de ces peptides et leur quantité peuvent être remises en question. Cette dernière observation témoigne d'un défaut certain de nos expériences pour évaluer l'immunogénicité de VP2. Un moyen de nous affranchir de l'usage de ces peptides serait l'utilisation de souris IFNAR^(-/-) après avoir testé l'effet du vecteur SG33 sur ces dernières. Une vaccination par les recombinants dans un second temps avec soumission à une épreuve virulente pourrait apporter des informations sur la capacité des recombinants à conférer une protection.

CONCLUSION

Même si la FCO en France paraît à présent totalement maîtrisée, il n'est pas impossible que cette maladie ressurgisse étant donné que les campagnes de vaccination ne sont plus rendues obligatoires. Les vaccins actuellement commercialisés ne permettent pas de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés. De plus, ils offrent une protection homotypique. Ainsi, il est toujours d'actualité de tenter d'élaborer des vaccins multi-sérotypes et s'intégrant dans la stratégie DIVA. C'est donc naturellement vers la stratégie recombinante que de nombreuses études se sont tournées pour tenter d'élaborer ce type de vaccin.

La protéine VP2 du BTV est à l'origine de la synthèse d'anticorps neutralisants protecteurs et est immunogène pour les lymphocytes T cytotoxiques chez les ovins. Elle présente donc un grand intérêt pour l'élaboration de vaccins. Un vecteur myxomateux SG33 présentant VP2 en intergénique a montré son efficacité en conférant une protection chez des ovins. Toutefois, son efficacité s'est révélée être plus faible que celle du vaccin inactivé actuellement sur le marché. Dans la continuité de cette étude et afin d'améliorer l'immunogénicité de ce vaccin, la stratégie de fusion avec expression de l'antigène étranger directement sur la particule virale a été privilégiée. Ainsi, deux recombinants incluant la protéine VP2 fusionnée aux protéines d'enveloppe M022L ou M071L du virus myxomateux ont été créés puis testés dans un modèle murin afin de comparer leur efficacité par rapport à la construction classique en intergénique.

Cependant, nos virus recombinants semblent avoir entraîné une réponse en anticorps anti-VP2 plus faible par rapport à celle fournie par la construction classique d'après les observations du test d'immunofluorescence. De plus, ces derniers ne sont pas neutralisants, même dans le cas d'une immunisation avec un vecteur construit par la méthode classique qui avait entraîné la présence d'anticorps neutralisants chez les ovins. Ceci permet de nous interroger sur la validité de notre modèle murin. Enfin, il n'a pas été possible de mettre en évidence une réponse cellulaire spécifique.

Même si le principal objectif qui était de démontrer une amélioration de l'immunogénicité de VP2 n'est pas atteint, cette technique de fusion n'est pas pour autant à abandonner. Cette étude confirme toutefois que le virus myxomateux est apte à présenter des antigènes grâce à cette stratégie étant donné qu'il induit une réponse humorale spécifique, certes non neutralisante mais bien présente.

De plus, la stimulation par les peptides VP2 n'était pas efficace dans nos expériences et nous a par conséquent empêchés de conclure sur la réponse cellulaire induite par ces recombinants. L'utilisation de souris IFNAR^(-/-) préalablement vaccinées puis subissant une épreuve virologique pourrait nous renseigner sur la capacité des recombinants à conférer une protection.

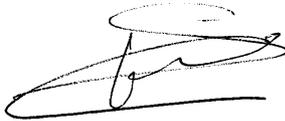
Cette stratégie de fusion a déjà montré son efficacité en utilisant des vecteurs de la famille des *Poxviridae* ou d'autres familles dans de nombreuses études ce qui témoigne de l'utilité d'envisager cette méthode dans l'optique d'améliorer un vecteur.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Stéphane BERTAGNOLI**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Edith ALBIN** intitulée « *Etude de l'immunogénicité en modèle murin de la protéine VP2 du virus Bluetongue exprimée en fusion avec des protéines d'enveloppe du virus myxomateux (souche SG33)* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18/10/2012
Professeur **Stéphane BERTAGNOLI**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



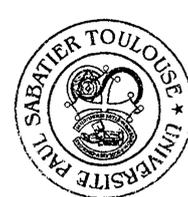
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur **Alain MILON**




Vu :
Le Président du jury :
Professeur **Christophe PASQUIER**



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur **Bertrand MONTHUBERT**

Mlle Edith ALBIN
a été admis(e) sur concours en : 2007
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/06/2011
a validé son année d'approfondissement le : 12/07/2012
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Bibliographie

Albina E., Zientara S., Sailleau C., Perrin A., Cêtre-Sossah C., Bréard E., Grillet C. 2007. La fièvre catarrhale ovine (bluetongue): quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*. Janvier-février 2007, Vol. 11, 1, pp. 1-13.

Andrew M, Whiteley P, Janardhana V, Lobato Z, Gould A, Coupar B. 1995. Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Veterinary immunology and immunopathology*. Aug 1995, Vol. 47, 3-4, pp. 311-22.

Aynaoud JM. 1991. Les vaccins vétérinaires de nouvelle génération. *INRA Productions animales*. 1991, Vol. 4, 1, pp. 89-95.

Backx A, Heutink R, van Rooij E, van Rijn P. 2009. Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Veterinary microbiology*. 18 Sep 2009, Vol. 138, 3-4, pp. 235-43.

Barchichat S., Katz E. 2002. Immunization of rabbits with a modified vaccinia Ankara recombinant virus bearing the HIV envelope antigen on its outer membrane. *Virus Research*. December, 2002, Vol. 90, 1-2, pp. 243-251.

Baudry C., Brezellec H. 2006. *Microbiologie-Immunologie, exercices d'application. Deuxième édition*. Rueil-Malmaison : Groupe Liaisons, 2006. pp. 101-102.

Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, Boilletot E, Vautherot JF, Rasschaert D, Laurent S, Petit F, Boucraut-Baralon C, Milon A. 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Journal of virology*. Aug 1996, Vol. 70, 8, pp. 5061-6.

Bertagnoli S., Pignolet B., Gelfi J., Camus-Bouclainville C. 2011. *Leporipoxvirus-derived vaccine vectors*. . US 2011/0052626 A1 United States, 3 Mar 2011. Patent Application Publication.

Boone JD, Balasuriya UB, Karaca K, Audonnet JC, Yao J, He L, Nordgren R, Monaco F, Savini G, Gardner IA, Maclachlan NJ. 2007. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine*. 8 Jan 2007, Vol. 25, 4, pp. 672-8.

Bosquet G. 2007. Signes cliniques de FCO observés sur le terrain dans le Nord et l'Est de la France. *Bulletin des GTV*. Oct 2007, 41, pp. 11-15.

Bowen RA, Howard TH, Pickett BW. 1985. Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls. *Progress in clinical and biological research*. 1985, Vol. 178, pp. 91-6.

Brun A, Albina E, Barret T, Chapman DA, Czub M, Dixon LK, Keil GM, Klonjowski B, Le Potier MF, Libeau G, Ortego J, Richardson J, Takamatsu HH. 2008. Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems. *Vaccine*. 2 Dec 2008, Vol. 26, 51, pp. 6508-28.

Bukreyev A., Marzi A., Feldmann F., Zhang L., Yang L., Ward JM., Dorward DW., Pickles RJ., Murphy BR., Feldmann H., Collins PL. 2009. Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge. *Virology*. January, 2009, Vol. 383, 2, pp. 348-361.

Calvo-Pinilla E, Rodríguez-Calvo T, Anguita J, Sevilla N, Ortego J. 2009. Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor. *PloS One*. 2009, Vol. 4, 4 : e5171.

Camus-Bouclainville C, Gretillat M, Py R, Gelfi J, Guérin JL, Bertagnoli S. 2011. Genome sequence of SG33 strain and recombination between wild-type and vaccine myxoma viruses. *Emerging Infectious Diseases*. Apr 2011, Vol. 17, 4, pp. 633-8.

Caracappa S, Torina A, Guercio A, Vitale F, Calabrò A, Purpari G, Ferrantelli V, Vitale M, Mellor PS. 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *The veterinary record*. Jul 2003, Vol. 153, 3, pp. 71-4.

Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL. 2005. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *The journal of general virology*. May 2005, Vol. 86, Pt 5, pp. 1279-90.

Caruso Agathe. 2009. *Evaluation de la protéine VP7 pour la protection des ovins vis-à-vis du virus bluetongue (BTV) lors d'un essai vaccinal utilisant le vecteur poxvirus SG33.* Toulouse 3 : Thèse de doctorat vétérinaire, 2009.

Chaignat V, Worwa G, Scherrer N, Hilbe M, Ehrensperger F, Batten C, Cortyen M, Hofmann M, Thuer B. 2009. Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Veterinary microbiology*. 2 Jul 2009, Vol. 138, 1-2, pp. 11-19.

Cirad : site consacré à la fièvre catarrhale ovine (bluetongue). *Surveillance Fièvre catarrhale du mouton - Journées de restitution 2011 du Programme national de surveillance des*

populations de Culicoides. [En ligne]

http://bluetongue.cirad.fr/FichiersComplementaires/JR2011_Resultats2010.pdf.

Cirad : site consacré à la fièvre catarrhale ovine (bluetongue). *Surveillance Fièvre catarrhale du mouton*. [En ligne] [Citation : 16 Janvier 2012.]

http://bluetongue.cirad.fr/la_fco_en_bref/les_culicoides/leur_role_vecteur/historique.

Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Shaw AE, Anthony S, Bachanek-Bankowska K, Kgosana L, bin-Tarif A, Carpenter S, Müller-Doblies UU, Takamatsu HH, Mellor PS, Mertens PP, Oura CA. 2007. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *The Veterinary record*. 25 Aug 2007, Vol. 161, 8, pp. 253-61.

De Clercq K, Vandebussche F, Vandemeulebroucke E, Vanbinst T, De Leeuw I, Verheyden B, Goris N, Mintiens K, Méroc E, Herr C, Hooybergs J, Houdart P, Sustronck B, De Deken R, Maquet G, Bughin J, Saulmont M, Lebrun M, Bertels G, Miry C. 2008. Transplacental bluetongue infection in cattle. *the veterinary record*. 26 Apr 2008, Vol. 162, 17, p. 564.

DeMaula CD, Bonneau KR, MacLachlan NJ. 2000. Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus Research*. Mar 2000, Vol. 67, 1, pp. 59-66.

Dimier J., Favier A-L., Gratier D., Spehner D., Pradeau-Aubreton K., Hebben M., Schultz P., Drillien R., Crance J-M. Construction de vecteurs vaccine (MVL) exprimant le gène de la glycoprotéine du virus Ebola. *Journées francophones de virologie à Paris 2010*.

Drillien R., Spehner D., Autran B., Garin D. 2003. Les poxvirus: une famille de vecteurs. *Virologie*. Juillet 2003, Vol. 7, 4, pp. 243-253.

Duteyrat JL, Gelfi J, Bertagnoli S. 2006. Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Archives of virology*. Nov 2006, Vol. 151, 11, pp. 2161-80.

Eloit M. 1998. Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. *INRA Productions animales*. 1998, Vol. 11, 1, pp. 5-13.

Embry A., Meng X., Cantwell A., Dube PH., Xiang Y. 2011. Enhancement of immune response to an antigen delivered by vaccinia virus by displaying the antigen on the surface of intracellular mature virion. *Vaccine*. July, 2011, Vol. 29, 33, pp. 5331-5339.

FCO-Info : *Le virus de la fièvre catarrhale ovine*. [En ligne] [Citation : 17 Janvier 2012.] <http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article326>.

FCO-Info : *Signes cliniques de FCO observés dans le Nord et l'Est de la France*. [En ligne] [Citation : 20 Janvier 2012.] <http://www.fcoinfo.fr/spip.php?article146>.

Foley HD, McGettigan JP, Siler CA, Dietzschold B, Schnell MJ. 2000. A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 19 Dec 2000, Vol. 97, 26, pp. 14680-5.

Foley HD, Otero M, Orenstein JM, Pomerantz RJ, Schnell MJ. 2002. Rhabdovirus-based vectors with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelopes display HIV-1-like tropism and target human dendritic cells. *Journal of virology*. Jan 2002, Vol. 76, 1, pp. 19-31.

Franceschi V, Capocefalo A, Calvo-Pinilla E, Redaelli M, Mucignat-Caretta C, Mertens P, Ortego J, Donofrio G. 2011. Immunization of knock-out α/β interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHV-4-based vector expressing BTV-8 VP2 antigen. *Vaccine*. 5 Apr 2011, Vol. 29, 16, pp. 3074-82.

Gibbs EP, Lawman MJ, Herniman KA. 1979 . Preliminary observations on transplacental infection of bluetongue virus in sheep-a possible overwintering mechanism. *Research in veterinary science*. Jul 1979 , Vol. 27, 1, pp. 118-20.

González JM, Figueras L, Ortega ME, Lozano M, de Arcaute MR, Royo R, Cebrián LM, Ferrer LM, Fariñas F, de Jalón JA, De las Heras M. 2010. Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines. *Veterinary record*. 12 Jun 2010, Vol. 166, 24, pp. 757-8.

Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic. Database for MHC ligands and peptide motifs. *SYFPEITHI* . [En ligne] <http://www.syfpeithi.de/home.htm>.

Hatzioannou, T., Delahaye, E., Martin, F., Russell, S.J., Cosset, F.L. 1999. Retroviral display of functional binding domains fused to the amino terminus of influenza hemagglutinin. *Human Gene Therapy*. 10 Jun 1999, Vol. 10, 9, pp. 1533-1544.

Hitachi Solutions. 2012. *ReaderFit*. [En ligne] 2012. <http://www.readerfit.com/>.

Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. 2008. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging infectious diseases*. Dec 2008, Vol. 14, 12, pp. 1855-61.

Huismans H, van der Walt NT, Cloete M, Erasmus BJ. 1987. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. *Virology*. Mar 1987, Vol. 157, 1, pp. 172-9.

Inumaru S, Roy P. 1987. Production and characterization of the neutralization antigen VP2 of bluetongue virus serotype 10 using a baculovirus expression vector. *Virology*. Apr 1987, Vol. 157, 2, pp. 472-9.

Katz E., Moss B. 1997. Immunogenicity of recombinant vaccinia viruses that display the HIV type 1 envelope glycoprotein on the surface of infectious virions. *AIDS research and human retroviruses*. November, 1997, Vol. 13, 17, pp. 1497-1500.

Katz E., Wolffe E. J., Moss B. 1997. The cytoplasmic and transmembrane domains of the vaccinia virus B5R protein target a chimeric Human Immunodeficiency Virus type 1 glycoprotein to the outer envelope of nascent vaccinia virions. *Journal of Virology*. April, 1997, Vol. 71, 4, pp. 3178-3187.

Khattar SK., Collins PL., Samal SK. 2010. Immunization of cattle with recombinant Newcastle disease virus expressing bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D induces mucosal and serum antibody responses and provides partial protection against BHV-1. *Vaccine*. April, 2010, Vol. 28, 18, pp. 3159-3170.

King A., Adams M., Carstens E., Lefkowitz. 2011. *Virus taxonomy, Ninth report of the international committee on taxonomy viruses*. s.l. : Elsevier Science Publishing Co Inc, 2011.

Kirschvink N, Raes M, Saegerman C. 2009. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *Veterinary Journal*. Nov 2009, Vol. 182, 2, pp. 244-51.

Koser ML., McGettigan JP., Tan GS., Smith ME., Koprowski H., Dietzschold B., Schnell MJ. 2004. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. June, 2004, Vol. 101, 25, pp. 9405-9410.

Kwak H., Mustafa W., Speirs K., Abdool AJ., Paterson Y., Isaacs SN. 2004. Improved protection conferred by vaccination with a recombinant vaccinia virus that incorporates a foreign antigen into the extracellular enveloped virion. *Virology*. May, 2004, Vol. 322, 2, pp. 337-348.

Langley WA, Bradley KC, Li ZN, Smith ME, Schnell MJ, Steinhauer DA. 2010. Induction of neutralizing antibody responses to anthrax protective antigen by using influenza virus vectors: implications for disparate immune system priming pathways. *Journal of virology*. Aug 2010, Vol. 84, 16, pp. 8300-8307.

Li ZN, Mueller SN, Ye L, Bu Z, Yang C, Ahmed R, Steinhauer DA. 2005. Chimeric influenza virus hemagglutinin proteins containing large domains of the Bacillus anthracis protective antigen: protein characterization, incorporation into infectious influenza viruses, and antigenicity. *Journal of virology*. Aug, 2005, Vol. 79, 15, pp. 10003-12.

Lobato ZI, Coupar BE, Gray CP, Lunt R, Andrew ME. 1997. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Veterinary immunology and immunopathology*. Nov 1997, Vol. 59, 3-4, pp. 293-309.

Maan S, Maan NS, Nomikou K, Veronesi E, Bachanek-Bankowska K, Belaganahalli MN, Attoui H, Mertens PP. 2011. Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PloS One*. 2011, Vol. 6, 10, p. e26147.

Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PP. 2007. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *The journal of general virology*. Feb 2007, Vol. 88, Pt 2, pp. 621-30.

Maclachlan NJ, Osburn BI. 2008. Induced brain lesions in calves infected with bluetongue virus. *The Veterinary Record*. 12 Apr 2008, Vol. 162, 15, pp. 490-1.

MacLachlan NJ. 1994. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. Aug-Nov 1994, Vol. 17, 3-4, pp. 197-206.

Mayo CE, Crossley BM, Hietala SK, Gardner IA, Breitmeyer RE, Maclachlan NJ. 2010. Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. *Transboundary and emerging diseases*. 1 Aug 2010, Vol. 57, 4, pp. 277-81.

McCabe VJ, Tarpey I, Spibey N. 2002. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine*. 7 Jun 2002, Vol. 20, 19-20, pp. 2454-62.

McKenna PM., Aye PP., Dietzschold B., Montefiori DC., Martin LN., Marx PA., Pomerantz RJ., Lackner A., Schnell MJ. 2004. Immunogenicity study of glycoprotein-deficient rabies virus expressing simian/human immunodeficiency virus SHIV89.6P envelope in a rhesus macaque. *Journal of virology*. December, 2004, Vol. 78, 24, pp. 13455-9.

Mebatsion T, Conzelmann KK. 1996. Specific infection of CD4+ target cells by recombinant rabies virus pseudotypes carrying the HIV-1 envelope spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 15 Oct 1996, Vol. 93, 21, pp. 11366-70.

Messud-Petit F., Bertagnoli S. 2000. Le virus myxomateux: de l'agent pathogène au vecteur vaccinal. *Virologie*. Nov-Dec 2000, Vol. 4, 6, pp. 453-62.

Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire. *Vademecum Symptômes et lésions de la FCO*. [En ligne] [Citation : 2012 Février 28.] <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/vademecum1.pdf>.

Moss B. 1996. Poxviridae: the viruses and their replication. [auteur du livre] Knipe D., Howley P. Fields B. *Fields virology, Third Edition, Volume 2*. New-York : Lippincott - Raven Publishers, 1996, pp. 2637-2671.

Moss B. 2001. Poxviridae: The viruses and their replication. [auteur du livre] D. M., Howley, P. M. Knipe. *Fields Virology, Fourth Edition*. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 2001, pp. 2649-2883.

Mustafa W, Al-Saleem FH, Nasser Z, Olson RM, Mattis JA, Simpson LL, Schnell MJ. 2011. Immunization of mice with the non-toxic HC50 domain of botulinum neurotoxin presented by rabies virus particles induces a strong immune response affording protection against high-dose botulinum neurotoxin challenge. *Vaccine*. 20 Jun 2011, Vol. 29, 28, pp. 4638-45.

Napp S, Allepuz A, García-Bocanegra I, Alba A, Vilar MJ, Casal J. 2011. Quantitative assessment of the probability of bluetongue virus transmission by bovine semen and effectiveness of preventive measures. *Theriogenology*. 15 Mar 2011, Vol. 75, 5, pp. 920-32.

Niedbalski W. 2011. Bluetongue vaccines in Europe. *Polish journal of veterinary sciences*. 2011, Vol. 14, 2, pp. 299-304.

OIE, Organisation mondiale de la santé animale. *Fiche technique sur la Bluetongue*. [En ligne] [Citation : 16 Janvier 2012.]
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/BLUETONGUE_FINAL.pdf.

Owens RJ, Rose JK. 1993. Cytoplasmic domain requirement for incorporation of a foreign envelope protein into vesicular stomatitis virus. *Journal of virology*. Jan 1993, Vol. 67, 1, pp. 360-5.

Perrin A, Albina E, Bréard E, Sailleau C, Promé S, Grillet C, Kwiatek O, Russo P, Thiéry R, Zientara S, Cêtre-Sossah C. 2007. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*. 17 Sep 2007, Vol. 25, 37-38, pp. 6774-83.

Pignolet B, Boullier S, Gelfi J, Bozzetti M, Russo P, Foulon E, Meyer G, Delverdier M, Foucras G, Bertagnoli S. 2008. Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants. *The Journal of general virology*. Jun 2008, Vol. 89, Pt 6, pp. 1371-9.

Pignolet Béatrice. 2007. *Interactions virus myxomateux-cellules hôtes : application à la vaccination chez les ruminants*. Toulouse 3, Thèse de doctorat (Microbiologie), 2007.

Roberts A, Buonocore L, Price R, Forman J, Rose JK. 1999. Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *Journal of virology*. May 1999, Vol. 73, 5, pp. 3723-32.

Roy P, Bishop DH, LeBlois H, Erasmus BJ. 1994. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine*. Jul 1994, Vol. 12, 9, pp. 805-11.

Roy P, Urakawa T, Van Dijk AA, Erasmus BJ. 1990. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *Journal of virology*. May 1990, Vol. 64, 5, pp. 1998-2003.

Roy P. 2001. Orbiviruses. [auteur du livre] HOWLEY P. M. KNIPE D. M. *Fields Virology, Fourth Edition, Volume 2*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 1835 – 1866.

Saegerman C, Bolkaerts B, Baricalla C, Raes M, Wiggers L, de Leeuw I, Vandebussche F, Zimmer JY, Haubruge E, Cassart D, De Clercq K, Kirschvink N. 2011. The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. *Veterinary journal*. Jan 2011, Vol. 187, 1, pp. 72-80.

Sailleau C., Bréard E., Zientara S. 2011. Méthode de diagnostic des Orbivirus des ruminants. *Le Point Vétérinaire*. Mai 2011, Vol. 315, pp. 64-68.

Savini G, MacLachlan NJ, Sanchez-Vizcaino JM, Zientara S. 2008. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. Mar 2008, Vol. 31, 2-3, pp. 101-20.

Schnell MJ, Buonocore L, Boritz E, Ghosh HP, Chernish R, Rose JK. 1998. Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *The EMBO Journal*. 10 Aug 1998, Vol. 17, 5, pp. 1289-96.

Schnell MJ., Buonocore L., Kretzschmar E., Johnson E., Rose JK. 1996. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. October, 1996, Vol. 93, 21, pp. 11359-65.

Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S. 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary research*. Sep-Oct 2008, Vol. 39, 5, p. 46.

Smith M-E., Koser M., Xiao S., Siler C., McGettigan J P., Calkins C., Pomerantz R J., Dietzschold B., Schnell M. 2006. Rabies virus glycoprotein as a carrier for anthrax protective antigen. *Virology*. 2006, Vol. 353, pp. 344-356.

Surveillance network for bluetongue. [En ligne] [Citation : 02 Février 2012.]
<http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>.

Takamatsu HH, Mellor PS, Mertens PP. 2004. A potential overwintering mechanism for bluetongue virus--recent findings. *Veterinaria italiana*. Oct-Dec 2004, Vol. 40, 4, pp. 456-61.

Top S, Foucras G, Deplanche M, Rives G, Calvalido J, Comtet L, Bertagnoli S, Meyer G. 2012. Myxomavirus as a vector for the immunisation of sheep: Protection study against challenge with bluetongue virus. *Vaccine*. 21 Feb 2012, Vol. 30, 9, pp. 1609-16.

ViralZone. [En ligne] [Citation : 12 Janvier 2012.]
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/153.html.

Viville Jean-Sébastien. 2010. *Efficacité d'un vaccin inactivé contre une inoculation d'épreuve à BTV-8 réalisée sur des béliers reproducteurs une semaine avant la période officielle de couverture vaccinale: étude clinique, virologique et impact sur la qualité de la semence.* Toulouse 3, Thèse de doctorat vétérinaire, 2010.

Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor P, Takamatsu H, Anderson J, Thevasagayam J, Fleming MJ, Mertens PP, Black DN. 1996 . Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*. 1 Jun 1996 , Vol. 220, 1, pp. 227-31.

White DM, Wilson WC, Blair CD, Beaty BJ. 2005. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *The Journal of general virology*. Feb 2005, Vol. 86, Pt 2, pp. 453-62.

Wilson A, Darpel K, Mellor PS. 2008. Where does bluetongue virus sleep in the winter? *PLoS Biology*. 26 Aug 2008, Vol. 6, 8.

Wilson AJ, Mellor PS. 2009 Sep 27. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*. 27 Sep 2009 Sep 27, Vol. 364, 1530, pp. 2669-81.

Zanella G, Durand B, Sellal E, Breard E, Sailleau C, Zientara S, Batten CA, Mathevet P, Audeval C. 2012. Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008-2009. *Theriogenology*. 1 Jan 2012, Vol. 77, 1, pp. 65-72.