



**HAL**  
open science

# Le virus myxomateux, vecteur vaccinal chez les ruminants : application à la bluetongue

Sokunthea Top

► **To cite this version:**

Sokunthea Top. Le virus myxomateux, vecteur vaccinal chez les ruminants : application à la bluetongue. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2012. Français. NNT : 2012TOU30017 . tel-02809665

**HAL Id: tel-02809665**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02809665v1>**

Submitted on 29 Sep 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité : *Virologie*

---

Présentée et soutenue par *Sokunthea TOP*

Le 22 Février 2012

**Titre :** *Le virus myxomateux, vecteur vaccinal chez les ruminants : application à la bluetongue*

---

### JURY

*Dr Gilles MEYER, Maître de conférences à l'ENVT.....Directeur de thèse*  
*Dr Gilles FOUCRAS, Professeur à l'ENVT.....Co-Directeur de thèse*  
*Dr Gerd SUTTER, Professeur à l'université vétérinaire de Munich.....Rapporteur*  
*Dr Robert DRILLIEN, Directeur de Recherche à l'INSERM.....Rapporteur*  
*Dr Jacques IZOPET, Professeur à l'UPS Toulouse III.....Examineur*  
*Dr Emmanuel ALBINA, Directeur de recherche au CIRAD.....Examineur*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)*  
**Unité de recherche :** *UMR 1225 INRA/ENVT*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr Gilles MEYER ; Dr Gilles FOUCRAS*  
**Rapporteurs :** *Dr Gerd SUTTER ; Dr Robert DRILLIEN*







**A notre jury de thèse**

**A monsieur le professeur Jacques IZOPET**

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

Hommages respectueux.

**A messieurs le professeur Gerd SUTTER et le docteur Robert DRILLIEN**

Qui nous ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse,

Sincères et respectueux remerciements.

**A messieurs le docteur Emmanuel ALBINA**

Qui nous fait l'honneur d'accepter de participer à notre Jury de thèse,

Sincères et respectueux remerciements.

**A messieurs le docteur Gilles MEYER et le professeur Gilles Foucras**

Qui m'ont confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,

Très sincères remerciements.

Cette thèse a été cofinancée par L'**INRA** et le **CIRAD**.

Je tiens donc à remercier tous les collaborateurs qui ont participé à ce travail, Emmanuel Albina, Christian LeGoff, Laurence Ledieu, Valérie Rodrigues, Stephan Zientara, Emmanuel Bréard, Isabelle Schwartz, Coraline Bouet, Vanessa Contreras.

## REMERCIEMENTS

---

Un très grand merci

A toute l'équipe "Interactions Hôte-Virus et Vaccinologie",

A Gillou, Chef, par où commencer...merci mille fois pour tout ce que tu m'as apporté aussi bien humainement que scientifiquement, et surtout, ce qui n'était pas une mince affaire, de m'avoir supportée. Derrière ta carapace de "stressator", tu as su être patient, me soutenir, me motiver et me guider jusqu'au bout. Tes multiples et infinies corrections resteront longtemps gravées dans ma mémoire et le mot "rendement" hurlé avec ta voie stridente résonne encore dans ma tête, mais ce n'est rien à côté des bons moments que nous avons partagés (comme nos réunions bières, l'épisode où tu m'as montré à quoi ressemblait le cerveau d'un mouton ou me faire faire le tour des rumeries de St Malo,...). Et oui la thèse avec toi c'était tout un apprentissage. Merci pour tout "Papa 1".

A Stéphane, Chefounet, je sais qu'officiellement tu ne fais pas partie du jury ni des directeurs de thèse, mais sur le terrain tu as énormément contribué à cette thèse. C'est grâce à toi que j'en suis arrivée là. Depuis mon premier stage de M1 sous ton encadrement, ta disponibilité, ton écoute, tes conseils, ton soutien scientifique, technique et moral, ta bonne humeur et ta "positive attitude" sans faille m'ont ravie et m'avaient donné envie de continuer dans le domaine de la recherche. Pour tout cela, merci infiniment "Papa 3".

A Jean-Luc, radar et voleur de chocolat par excellence, grâce à ta "pseudo-méchanceté" et "ton sadisme", tu nous a permis d'avancer et surtout de mettre en place la solidarité au sein du poulailler. Merci pour les ordis, maintenant on sait qu'un chef, par définition, dit toujours non...

A Jackie, nos débuts quelque peu mouvementés mais néanmoins mémorables, me font maintenant bien rire. Ta disponibilité, tes conseils techniques, ton œil critique et ta gentillesse m'ont beaucoup aidée tout au long de cette thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris.

## REMERCIEMENTS

---

A Josy, Brigitte, Aurélie, Sylvie, Robert merci pour votre aide, votre bonne humeur et votre gentillesse. Nos discussions au cours desquelles on pestait sur les chefs vont beaucoup me manquer. A quand notre soirée belote les filles?

A Martine Deplanche et Martine Moulignié, vous m'avez été d'une aide et d'un soutien précieux tout au long de cette thèse, notamment pour la préparation des quantités industrielles de milieu, de cellules, de F300, les centaines et centaines de Ficoll et ces interminables expérimentations animales. On les a eus ces moutons Martine D. Merci infiniment.

A Christelle, déesse de la culture générale, merci pour tes conseils, ton aide et nos bons moments à tricher (enfin nous le poulailler à tricher et toi à trouver les bonnes réponses toute seule) pour gagner "Qui veut prendre ma place".

Et bien sûr aux membres du poulailler,

A ceux qui sont partis, Sophie, Magalie,

A Béa, toi ma première encadrante, merci pour tout ce que tu m'as appris, ta bonne humeur, ton enthousiasme, ton autodérision, ton aide et tes conseils. Vivement nos prochaines soirées filles!

A Bernididou, tes séances de serpillère et tes figures acrobatiques au badminton me font encore rire. Je n'ai toujours pas rencontré quelqu'un capable de te détrôner ô toi, champion du monde du mangeur de raclette. Vive l'Alsace, la bière et surtout la raclette!

A Léni, merci pour ton imitation inégalable du chameau, ton parfait accent asiatique, ta gentillesse, ta soirée où j'ai fini dans ta microscopique piscine. A très bientôt j'espère.

A Sébastounet, merci d'avoir supporté tous ces jacassements de filles pendant tes années de solitude en tant que seul garçon du poulailler, pour tous tes chocolats donnés ou volés dans tes superbes cachettes, pour ton soutien, ton aide, ta gentillesse inégalable et surtout nos

## REMERCIEMENTS

---

discussions entre thésards sur l'avenir de la recherche qui aboutissaient toujours à "qu'est ce qu'on va devenir".

A ceux qui étaient de passage, Béryl, Caro, Benji, Aurélie, Laetitia, Marlène, Jérôme, Germain.

A Agathe, nos séances de contention du mout-mout ont été mémorables, merci pour ton aide, ta gentillesse, on le saura maintenant qu'il ne faut pas faire les prises de sang sur les femelles avant d'aller dans le box des mâles.

A Coco, merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme, ton soutien, tes sempiternelles chansons et tes tueries de canards. Tu resteras mon idole au Time's up, vive Jimmy Somerville, le fleuve Mao Zedong et le président des Etats-Unis Winston Churchill...

A celui qui reste, Gui-Gui, merci pour tous les fous rires et bons moments passés au poulailler, tes chansons avec Coco, nos blagues plus que crasseuses, notre pseudo amour virtuel, toutes ces choses qui ont égayé ces années de thèse.

A celui qui arrive, Titi, merci pour ta gentillesse et ton aide précieuse en informatique.

A l'équipe IMM,

A Grand Gilles, ton aide et ton soutien ont été très précieux notamment dans mes débuts quelque peu chaotiques lors des contentions de moutons, des prises de sang. Je te suis reconnaissante de m'avoir fait découvrir le monde des immunologistes, le Ficoll et le CFSE n'ont plus de secret pour moi. Merci pour ta disponibilité, tes conseils avisés et ton optimisme à toute épreuve. J'ai énormément appris à tes côtés, merci pour tout "Papa 2". Par contre, je retiens quand même que tu as été complice de Gillou, pour m'avoir fait croire qu'il fallait que je brosse les dents de Bounty tous les jours...

## *REMERCIEMENTS*

---

A Eliane, Christian, Cécile C, Mehdi, Cécile B, Emmanuelle, Guillaume, Séverine, pour leur aide et leur gentillesse.

A l'équipe Coli,

A Jean-Phi, Ascel, Claude, Marie, Michelle.

A Laurence, Michèle et Marie.

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



## *DEDICACES*

---

Cette thèse est dédiée

A ma famille,

A ma sœur Sokunthy, nous avons vécu tant de moments ensemble, des bons comme des mauvais, sans toi je ne sais pas où je serais. Merci infiniment pour ton amour inconditionnel, d'être toujours là et de croire en moi. Je suis consciente que tu as sacrifié énormément pour que je puisse faire mes études, je t'en serai éternellement reconnaissante. Cette thèse je te la dois et j'espère que tu seras fière de moi. Je t'aime ma sœurette.

A toi chéri, qui m'a supportée toutes ces années et j'espère qu'il y en aura bien plus encore. Pour tes petites attentions que j'ai remarquées quelque fois trop tard (encore pardon), ton amour, ton soutien, ta gentillesse. Une page se tourne, il ne tient qu'à nous d'en écrire la suite, ensemble et qui sait avec plein de futurs "mini nous"...

A mon frère Sieng-Ly.

A ma sœur Kim.

A Narong, Daro, Dawin, Dana.

A Thomas, mon très cher et tendre Bo-F, merci pour ta gentillesse, ton amour et ton soutien, à nos éternels jeux des "je t'aime moi non plus". On va l'écrire notre tube de l'année. Vive les moules et le Yukulele!

A Béatrice, Jacques, merci pour votre amour et votre soutien.

A Kattalin, Anita, Xavière, Thibault.

A Nathalie, Martine, Francis.

A Mireille.

## *DEDICACES*

---

A mes amis,

A l'équipe des nouilles ou " Bad Team" ou tout simplement aux badistes, dans le désordre, Spaghetti, Aude, Maud, Rico, Elodie, Marie-Laure, Mitch, Julien, Christophe D, Christophe A, Nicolas, Bastien, Yannick, Sébastien, Tim, JJ, Alexandra, Nono, Cécile. Badminton forever!

Aux non badistes, Fred, Sophie, Kamel, Greg, Val, Armelle, Manu, Nikos, Jorgina...

A tous les animaux sacrifiés pour la science. Une spéciale dédicace à toi mout-mout 273.

## ABREVIATIONS

---

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>APC</b>	Antigen Presenting Cell ou cellule présentatrice d'antigène
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNdb</b>	ARN double brin
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>BM-DC</b>	Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse
<b>BT</b>	Bluetongue
<b>BTV</b>	Bluetongue Virus ou virus de la Bluetongue
<b>CEV</b>	Cell-associated Enveloped Virus ou virus enveloppé associé à la cellule
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>CLP</b>	Core-like particule
<b>CNPV</b>	Canaripoxvirus
<b>CTL</b>	Cytotoxic T lymphocytes ou lymphocytes cytotoxiques
<b>DC</b>	Dendritic cell ou cellule dendritique
<b>DISC</b>	Death-Inducing Signaling Complex
<b>DIVA</b>	Differentiated Infected from Vaccinated Animals
<b>EEV</b>	Extracellular Enveloped Virus ou virus enveloppé extracellulaire
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EGF</b>	Epidemal Growth Factor
<b>eIF</b>	eukaryotic Initiation Factor ou facteur d'initiation eucaryote
<b>FCO</b>	Fièvre catharrale ovine
<b>GFP</b>	Green Florescent Protein
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus ou virus de l'immunodeficienc humaine
<b>IEV</b>	Intracellular Enveloped Virus ou virus enveloppé intracellulaire
<b>IFN</b>	Interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IMV</b>	Intracellular Mature Virus ou virus mature intracellulaire
<b>IRES</b>	Internal Ribosomal Entry Site
<b>Da</b>	kilo Dalton

## ABREVIATIONS

---

<b>kpb</b>	Kilo Paire de bases
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LC</b>	Langerhans Cell ou cellule de Langerhans
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LTh</b>	Lymphocytes T helper ou lymphocytes auxiliaires
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MGF</b>	Myxoma Growth Factor ou facteur de croissance du MYXV
<b>MNF</b>	Myxoma Nuclear factor
<b>Mo-DC</b>	Monocyte-derived DC ou DC dérivées de monocytes
<b>MOI</b>	Multiplicity Of Infection ou multiplicité d'infection
<b>MTS</b>	Mitochondrial Target Signal ou signal de localisation mitochondriale
<b>MVA</b>	Modified Vaccinia virus strain Ankara
<b>MYXV</b>	MYXoma Virus ou virus de la myxomatose
<b>NK</b>	Cellule Natural Killer
<b>nm</b>	nanomètre
<b>2'5' oligo A</b>	2'5' oligoadénylate
<b>2'5' OS</b>	2'5' oligoadénylate synthetase
<b>ORF</b>	Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell (cellules mononucléées du sang périphérique)
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>pDC</b>	Plasmacytoïd dendritic cell ou cellule dendritique plasmacytoïde
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PFU</b>	Plage Formant Unité
<b>PKR</b>	Protein Kinase dépendante de l'ARN double brin
<b>PMA/Iono</b>	Phorbol Myristate Acetate/Ionomycine
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>RHDV</b>	Rabbit Hemoragic Disease Virus ou virus de la maladie hémorragique du lapin
<b>RING</b>	Really Interesting New Gene
<b>RIT</b>	Région Inversée Terminale
<b>RK13</b>	Rabbit Kidney cells ou cellules de rein de lapin
<b>RL5</b>	Rabbit Lymphocyte ou lymphocyte de lapin (lignée cellulaire)
<b>RNase I</b>	Ribonuclease L
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute

## ABREVIATIONS

---

<b>RPMIc</b>	RPMI complet
<b>RT</b>	Reverse Transcription
<b>SFGF</b>	Shope Fibroma Growth Factor
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Foetal
<b>TCR</b>	T-cell receptor
<b>TK</b>	Thymidine Kinase
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNFR</b>	Récepteur du TNF
<b>VACV</b>	Vaccinia Virus ou virus de la vaccine
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VGf</b>	Vaccinia virus Growth Factor
<b>VLP</b>	Virus-Like Particule



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Pathogénèse du virus myxomateux.....	9
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique des poxvirus .....	14
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des différentes formes virales de Poxviridae .....	16
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique du génome viral de Poxviridae .....	18
<b>Figure 5.</b> Cycle de réplication .....	19
<b>Figure 6:</b> Mécanisme d'échappement du MYXV à l'apoptose.....	29
<b>Figure 7.</b> Inhibition de la voie des IFN par le MYXV .....	34
<b>Figure 8:</b> Principe de construction d'un vecteur recombinant par recombinaison.....	45
<b>Figure 9.</b> Rôles de DC dans la réponse immune innée et adaptative .....	53
<b>Figure 10.</b> Répartition de la FCO dans le monde.....	62
<b>Figure 11.</b> Situation de la France en 2008.....	64
<b>Figure 12.</b> Représentation schématique des relations antigéniques entre sérotypes du BTV .	70
<b>Figure 13.</b> Structure et morphologie du virus de la FCO .....	70
<b>Figure 14.</b> Cycle de réplication du BTV .....	73
<b>Figure 15:</b> Schéma synthétique de la pathogénie du BTV .....	76
<b>Figure 16.</b> Les BM-DC infectées par le SG33 sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes CD4 <sup>+</sup> et d'induire leur prolifération.....	114
<b>Figure 17.</b> Construction du virus recombiné SG33-VP7 .....	135
<b>Figure 18.</b> Protocole expérimental .....	137
<b>Figure 19.</b> Activation des LT CD4 <sup>+</sup> (J90) de l'ensemble des moutons.....	141
<b>Figure 20.</b> Réponse anticorps anti-SG33-VP7 de tous les moutons aux temps J0, J24, J54 et J154 après la première immunisation.....	143
<b>Figure 21.</b> Réponse anticorps anti-VP7 de tous les moutons aux temps J54 et J154 après la première immunisation.....	143

<b>Figure 22.</b> Suivi du score clinique après inoculation d'épreuve par le BVT-8.....	146
<b>Figure 23.</b> Suivi de la température rectale après inoculation d'épreuve par le BTV-8.....	146
<b>Figure 24.</b> Virémie des moutons après inoculation d'épreuve par le BTV-8.....	148
<b>Figure 25.</b> Réponse anticorps anti-VP7 après l'inoculation d'épreuve par le BTV-8 .....	148
<b>Figure 26.</b> Scénario possible du rôle des cellules circulantes et résidentes dans la présentation des antigènes aux LT suite à une infection par le MYXV .....	158

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Critères de gradation de la virulence des souches de virus myxomateux .....	11
<b>Tableau 2:</b> Classification des <i>chordopoxvirinae</i> .....	13
<b>Tableau 3.</b> Facteurs impliqués dans les interactions du MYXV avec son hôte .....	26
<b>Tableau 4.</b> Exemples de spécificité <i>in vitro</i> et spectre d'hôte <i>in vivo</i> de certains poxvirus....	26
<b>Tableau 5.</b> Exemples d'essais vaccinaux avec des poxvirus recombinés contre des maladies virales .....	59
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO .....	72
<b>Tableau 7.</b> Récapitulatif de l'essai vaccinal avec le vecteur SG33-VP7 avant inoculation d'épreuve.....	144

<b>Avant-propos .....</b>	<b>1</b>
<b>Partie I : Synthèse bibliographique .....</b>	<b>5</b>
<b>I. Le virus myxomateux (MYXV) .....</b>	<b>7</b>
<b>A. Le MYXV et la myxomatose .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Historique .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Pathogénie .....</b>	<b>8</b>
<b>B. Caractéristiques généraux du MYXV .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Classification .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Structure des virions .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Organisation du génome .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Cycle viral .....</b>	<b>17</b>
4.1. Entrée du virion.....	20
4.2. Régulation de l'expression des gènes viraux .....	21
4.2.1. Expression des gènes précoces.....	21
4.2.2. Réplication du génome viral.....	22
4.2.3. Expression des gènes intermédiaires et tardifs.....	22
4.3. Assemblage et maturation des virions .....	22
<b>C. Interactions poxvirus/hôtes .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Tropisme cellulaire .....</b>	<b>24</b>
1.1. Particularité du tropisme cellulaire des poxvirus.....	27
1.2. Facteurs d'hôtes .....	27
<b>2. Contrôle du cycle cellulaire .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Contrôle de l'apoptose .....</b>	<b>28</b>
<b>4. Interférence avec le système immunitaire.....</b>	<b>30</b>
4.1. Réponse de l'hôte à l'infection .....	30
4.2. Interférence avec les IFN .....	32

---

4.3. Inhibition de la réponse inflammatoire .....	33
<b>II. Les poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux .....</b>	<b>35</b>
<b>A. Les bases du choix des poxvirus .....</b>	<b>36</b>
<b>1. Vecteurs poxviraux réplicatifs .....</b>	<b>36</b>
1.1. Le virus de la vaccine .....	36
1.2. Autres poxvirus .....	37
<b>2. Vecteurs poxviraux non réplicatifs .....</b>	<b>38</b>
2.1. MVA et NYVAC .....	38
2.2. Les Avipoxvirus chez les mammifères .....	39
2.3. Exemple d'autres virus : MYXV .....	40
<b>3. Les avantages des vecteurs poxvirus .....</b>	<b>41</b>
<b>4. Les limites des poxvirus .....</b>	<b>43</b>
<b>B. Modalités de construction des poxvirus recombinants .....</b>	<b>44</b>
<b>1. Schéma général pour l'obtention d'un poxvirus recombinant .....</b>	<b>45</b>
<b>2. Construction des plasmides vecteurs d'insertion .....</b>	<b>46</b>
2.1. Choix des promoteurs .....	46
2.2. Sites d'insertion d'ADN étranger .....	46
2.2.1. Insertion intergénique .....	47
2.2.2. Insertion dans un gène ou un locus non essentiel .....	47
2.2.3. Insertion dans un gène essentiel .....	48
2.2.4. Fusion avec une protéine virale .....	48
2.3. Sélection des virus recombinants .....	49
<b>C. Evaluation des poxvirus en tant que vecteur vaccinal .....</b>	<b>50</b>
<b>1. Interactions des poxvirus avec les cellules dendritiques .....</b>	<b>50</b>
1.1. Activation des cellules dendritiques .....	51
1.2. Polarisation de la réponse immune par les cellules dendritiques .....	52

1.2.1. Th1.....	52
1.2.2. Th2.....	54
1.2.3. Th17.....	55
1.2.4. Threg.....	55
1.3. Exemples d'interactions cellules dendritiques/poxvirus.....	56
<b>2. Evaluation de l'efficacité des vecteurs poxvirus via des essais vaccinaux..</b>	<b>58</b>
<b>III. La fièvre catarrhale ovine ou bluetongue.....</b>	<b>60</b>
<b>A. Généralités.....</b>	<b>60</b>
<b>1. Historique.....</b>	<b>60</b>
<b>2. Distribution de la FCO.....</b>	<b>61</b>
<b>3. La maladie.....</b>	<b>65</b>
3.1. Chez les ovins.....	66
3.2. Chez les caprins et les bovins.....	67
3.3. Chez les autres herbivores.....	68
<b>B. Le virus de la bluetongue (BTV).....</b>	<b>68</b>
<b>1. Classification.....</b>	<b>68</b>
<b>2. Structure.....</b>	<b>69</b>
<b>3. Organisation génomique et protéines virales.....</b>	<b>71</b>
<b>4. Cycle de réplication.....</b>	<b>71</b>
<b>C. Physiopathologie de la fièvre catarrhale ovine.....</b>	<b>75</b>
<b>1. Pathogénie du BTV.....</b>	<b>75</b>
<b>2. Réponse de l'hôte.....</b>	<b>78</b>
2.1. Réponse inflammatoire.....	78
2.2. Réponse humorale.....	79
2.3. Réponse cellulaire.....	80
<b>D. Vaccination contre la FCO.....</b>	<b>81</b>

<b>1. Vaccins commercialisés : avantages et inconvénients</b> .....	81
1.1. Vaccins atténués.....	81
1.2. Vaccins inactivés .....	83
<b>2. Vaccins de "nouvelle génération"</b> .....	85
2.1. Les pseudoparticules virales produites en baculovirus .....	85
2.2. Vecteurs recombinants.....	87
2.3. Vaccins suicides ou DISC.....	88
<b>Objectifs du travail</b> .....	91
<b>Partie II: Etudes Expérimentales</b> .....	95
<b>I. Interactions cellules dendritiques et MYXV</b> .....	97
<b>A. Introduction</b> .....	97
<b>B. Article I</b> .....	97
<b>C. Conclusion</b> .....	112
<b>II. MYXV, application à la vaccination contre la FCO</b> .....	117
<b>A. Evaluation du pouvoir protecteur du recombinant SG33 des recombinants         exprimant les protéines structurales VP2 et VP5</b> .....	118
<b>1. Introduction</b> .....	118
<b>2. Article II</b> .....	118
<b>3. Conclusion</b> .....	127
<b>B. Evaluation du pouvoir protecteur du recombinant SG33 exprimant la protéine         structurale VP7</b> .....	132
<b>1. Introduction</b> .....	132
<b>2. Matériels et méthodes</b> .....	134

2.1. Cellules et virus.....	135
2.2. Protocole expérimental .....	136
2.3. Evaluation de la réponse immunitaire.....	138
2.3.1. Réponse cellulaire .....	138
2.3.2. Réponse humorale .....	138
2.4. Quantification de l'ARN viral .....	139
<b>3. Résultats .....</b>	<b>140</b>
3.1. Réponse immune induite par le recombinant SG33-VP7 .....	140
3.1.1. Réponse cellulaire .....	140
3.1.2. Réponse humorale .....	142
3.2. Etude de protection sur les moutons éprouvés avec du BTV-8 .....	145
3.2.1. Protection clinique.....	145
3.2.2. Protection virologique .....	147
3.3. Réponse immune induite après inoculation d'épreuve .....	147
<b>4. Discussion .....</b>	<b>149</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>153</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>171</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>184</b>



# AVANT-PROPOS



La fièvre catarrhale ovine (FCO) ou bluetongue est longtemps restée cantonnée entre les latitudes 35°S et 40°N, elle s'est récemment étendue dans le bassin méditerranéen, au Sud puis vers le Nord de l'Europe jusqu'à atteindre en 2007, les trois quarts des départements de la France. Cette épidémie a conduit à des campagnes de vaccination importantes qui ont permis une forte diminution du nombre de foyers. Il existe à l'heure actuelle sur le marché des vaccins à base de virus atténués et des vaccins à base de virus inactivés. Aucun de ces vaccins ne permet une protection croisée efficace entre les différents sérotypes. Par ailleurs, ils ne permettent pas de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés dans le cadre d'une stratégie dite DIVA (Differentiated Infected from Vaccinated Animals). De plus, pour les vaccins atténués, de nombreux problèmes restent non résolus tels que la qualité de l'atténuation ainsi que la possibilité d'une éventuelle réversion vers la virulence. Pour les vaccins inactivés, malgré leur efficacité, peu de données sur la réponse immunitaire induite sont disponibles actuellement. L'ensemble de la problématique vaccinale a généré depuis quelques années le développement de nouvelles stratégies dont l'objectif commun est l'induction d'une réponse immunitaire suffisante pour protéger efficacement les animaux contre plusieurs sérotypes et la possibilité de différencier animaux infectés et/ou vaccinés. Une approche possible consisterait à utiliser un vaccin vectorisé exprimant des antigènes du virus de la bluetongue (BTV), suffisamment conservés et immunogènes pour induire une protection croisée entre plusieurs sérotypes.

Dans ce cadre, les poxvirus représentent des vecteurs vaccinaux de choix car ils possèdent généralement un spectre d'hôte étroit, permettent l'introduction d'ADN étranger de taille importante et induisent une forte réponse immunitaire cellulaire. Parmi les poxvirus, le virus myxomateux (MYXV) a fait ses preuves en tant que vecteur vaccinal chez l'espèce cible le lapin, mais aussi chez l'espèce non cible le chat. C'est ainsi que dans ce travail, nous avons

envisagé l'utilisation de la souche atténuée SG33 du MYXV en tant que vecteur vaccinal non répliatif chez les ruminants.

Dans le présent manuscrit, la première partie sera essentiellement consacrée à une présentation des poxvirus et leur utilisation en général en tant que vecteurs vaccinaux, nous nous attarderons plus précisément sur le virus myxomateux. Ensuite la biologie de la bluetongue et les moyens de lutte mis en œuvre pour lutter contre cette maladie seront présentés. Dans la deuxième partie, seront abordés les résultats de nos recherches contenant deux volets, un volet *in vitro* de caractérisation des interactions entre le vecteur SG33 et les cellules dendritiques (DC) ovines, dont le rôle primordial dans la réponse immunitaire reste encore méconnu chez les ruminants et un volet de démonstration *in vivo*, de l'utilisation du vecteur SG33 comme vecteur vaccinal chez le mouton contre la FCO.

# **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **I. Le virus myxomateux (MYXV)**

### **A. Le MYXV et la myxomatose**

#### **1. Historique**

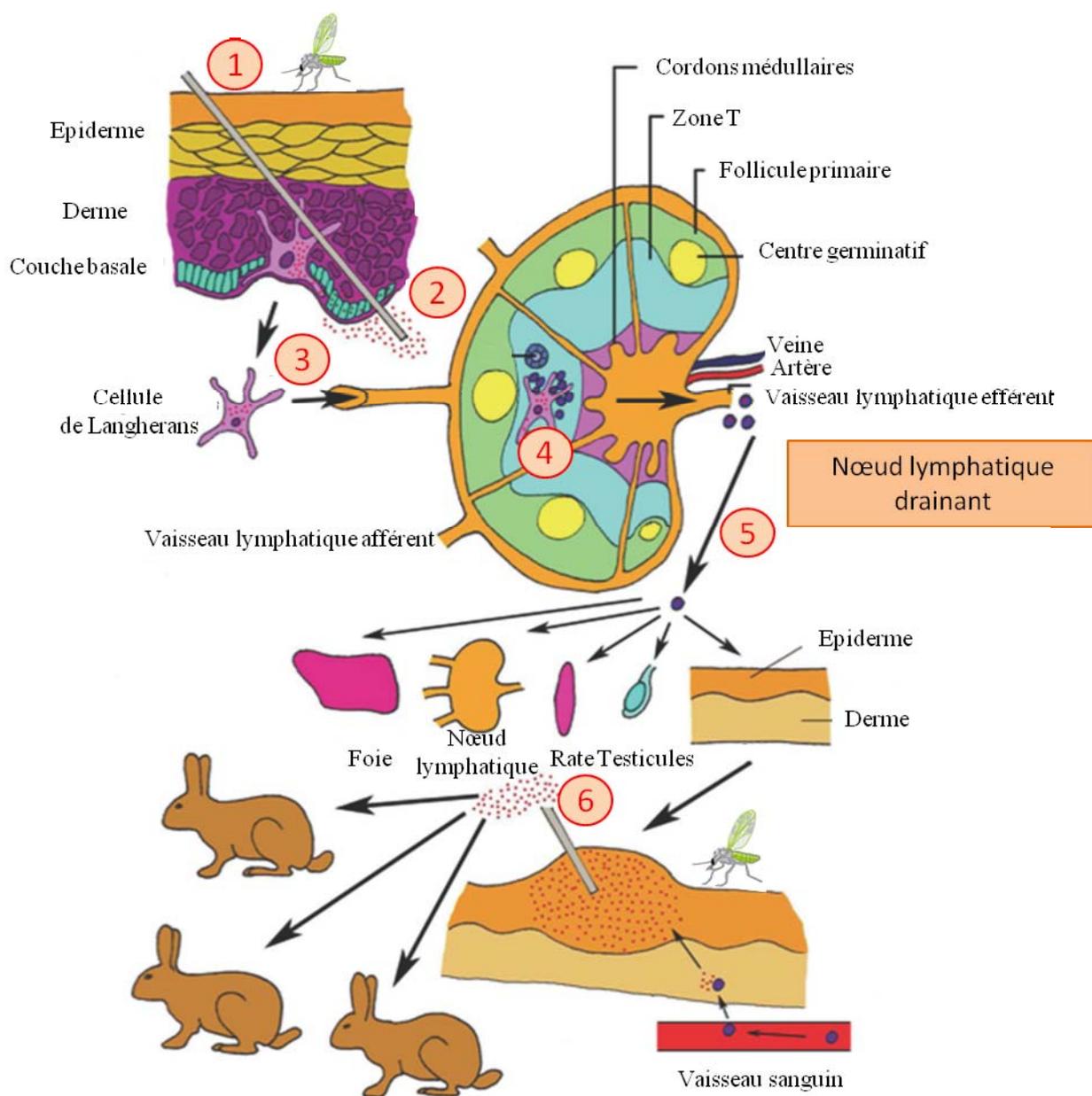
La myxomatose est une maladie infectieuse, contagieuse qui affecte essentiellement le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) et parfois le lièvre variable. Elle a été décrite pour la première fois en 1896 comme une maladie mortelle, caractérisée par l'apparition de nodules appelés myxomes. La maladie fut appelée myxomatose du grec *muxa*, mucus et *oma*, tumeur. Les individus infectés mourraient au bout d'une dizaine de jours en partie à cause de surinfections bactériennes. Dans les années 1950, face à la pullulation des lapins et aux nuisances causées par ceux-ci, l'Australie décida d'utiliser le virus myxomateux comme moyen de lutte biologique. Ce fut à l'origine de l'apparition et de l'extension de la maladie non seulement en Australie mais aussi en Europe par l'importation de lapins infectés. En France, la myxomatose a été introduite par le Dr Louis-Armand Delille, dans sa propriété d'Eure-et-Loir en Juin 1952 à partir d'un lapin importé illégalement. En 1957, elle était répandue sur tout le territoire français. Le programme d'éradication australien a finalement échoué car il n'avait pas pris en compte les différents processus d'adaptation-sélection qui ont permis l'émergence d'isolats viraux moins pathogènes et de lapins plus résistants vis-à-vis de la maladie (101, 102, 104).

## 2. Pathogénie (Figure 1)

Le MYXV est responsable d'une maladie souvent létale pour le lapin européen *Oryctolagus cuniculus*, la myxomatose. Cette maladie se traduit classiquement par la formation de lésions cutanées, appelées myxomes, et une atteinte de l'état général, associée à une grave immunodépression (remarque : il existe une forme dite "amyxomateux").

Au cours de son repas sanguin, l'arthropode vecteur permet au MYXV d'infecter directement les cellules du derme, majoritairement les cellules dendritiques, exprimant le CMH-II. Il a été mis en évidence que ces cellules représentent le site primaire de réplication du virus myxomateux (24). Les cellules dendritiques infectées migrent ensuite jusqu'au nœud lymphatique drainant le site d'inoculation puisque le virus y est détecté au bout de 24h. A ce stade, le MYXV va infecter majoritairement les lymphocytes T du paracortex du nœud lymphatique entraînant ainsi une réduction massive du nombre de lymphocytes T (24). A partir du deuxième jour, le virus va envahir l'organisme tout entier, principalement le poumon, la rate, les testicules et la peau. Bien que l'infection passe totalement inaperçue, le virus est présent dans le sang, les tissus, les sécrétions ou les excréments et le sujet devient contaminant pour ses congénères et pour les vecteurs. Le MYXV se réplique donc dans les lymphocytes et les macrophages, cellules exprimant le CMH-II, et le dysfonctionnement de ces cellules-clés du système immunitaire explique le tableau général d'immunodépression caractéristique de la maladie.

Entre le deuxième et le cinquième jour après infection, se manifestent les premiers signes cliniques de la maladie. Ils se caractérisent par une lésion cutanée au niveau du point d'inoculation qui évoluera vers une lésion œdémateuse appelée myxome. Au bout du cinquième jour, la distribution du virus ne cesse de s'accroître dans l'organisme provoquant ainsi des myxomes secondaires au niveau des paupières, des oreilles et de la zone anogénitale, accompagnés d'écoulements muqueux puis purulents dans la sphère oculo-nasale.



**Figure 1.** Pathogenèse du virus myxomateux (308). (1) Le lapin peut être contaminé par contact direct avec un autre animal infecté, par un arthropode vecteur suite à plusieurs repas sanguin sur un animal infecté ou par une inoculation directe. Le virus infecte les cellules épithéliales et les cellules du derme (2). Les cellules résidentes CMH-II positives, telles que les cellules de Langerhans sont aussi infectées (3). Ces dernières vont migrer vers le nœud lymphatique drainant, où elles vont présenter les épitopes viraux aux lymphocytes T. Les cellules de Langerhans transportent aussi des particules virales qui vont infecter majoritairement les lymphocytes T (4) entraînant leur mort et par conséquent une diminution locale de leur nombre. Grâce à l'infection des DC au site d'infection primaire, et la diffusion ultérieure par le biais du système lymphatique et vasculaire (5), le MYXV se propage ensuite à travers le corps dans de nombreux organes secondaires comme les poumons, les testicules, le foie et la rate. Des myxomes apparaissent aux niveaux de multiples sites secondaires sur la peau favorisant ainsi la dissémination du virus par des vecteurs (6).

A partir du sixième jour environ, les myxomes secondaires envahissent tout le corps de l'animal. Au cours des derniers stades, les symptômes s'aggravent, la multiplication virale s'accroît pour atteindre des titres maximaux le huitième ou le neuvième jour et baisser ensuite peu avant la mort qui survient au bout de dix jours pour les formes aiguës.

Le devenir de l'infection chez un sujet, est déterminé par plusieurs facteurs :

- la sensibilité de l'hôte qui tient tout d'abord à l'espèce puisque qu'*Oryctolagus* est beaucoup plus sensible que les autres espèces ; à la lignée puisque certaines lignées s'avèrent spontanément plus résistantes que d'autres ; mais aussi à l'âge car les lapereaux sont naturellement plus sensibles que les adultes.
- l'infectiosité et la dose virale ; en effet le degré de virulence de la souche détermine la durée d'incubation. Elle est de trois à sept jours pour une souche pleinement active, de quatre à neuf jours pour une même dose de virus atténué. Par ailleurs, la dose infectante doit être suffisante et dépasser le seuil de multiplication locale initiale.
- les modalités de contagion (majoritairement par voie vectorielle dans les cas classiques par un arthropode infecté) et de pénétration du virus (principalement par injection intradermique)

Ainsi cinq grades d'infectiosité peuvent être distingués, le grade I étant le plus élevé. Il est estimé en fonction du temps de survie, du taux de mortalité, de l'aspect du myxome primaire, de l'intensité et du temps d'apparition de la maladie, de la présence ou non de signes nerveux, de la charge virale et de la virulence des lésions (102, 105, 174) (**Tableau 1**).

<b>Grade de virulence</b>	<b>Taux de mortalité</b>	<b>Temps moyen de survie (jours)</b>
<b>I</b>	>99	< 13
<b>II</b>	95-99	14-16
<b>III</b>	70-95	17-28
<b>IIIa</b>	90-95	17-22
<b>IIIb</b>	70-90	23-28
<b>IV</b>	50-70	29-50
<b>V</b>	< 50	-

**Tableau 1.** Critères de gradation de la virulence des souches de virus myxomateux (102)

## B. Caractères généraux du MYXV

### 1. Classification

Le MYXV appartient aux *Poxviridae*, une famille virale importante comportant un grand nombre de virus responsables de maladies majeures chez l'Homme (Variole) et chez les animaux (Myxomatose, Variole ovine et caprine...). La famille des *Poxviridae* est divisée en deux sous-familles, les *Chordopoxvirinae* et les *Entomopoxvirinae* infectant respectivement les vertébrés et les invertébrés.

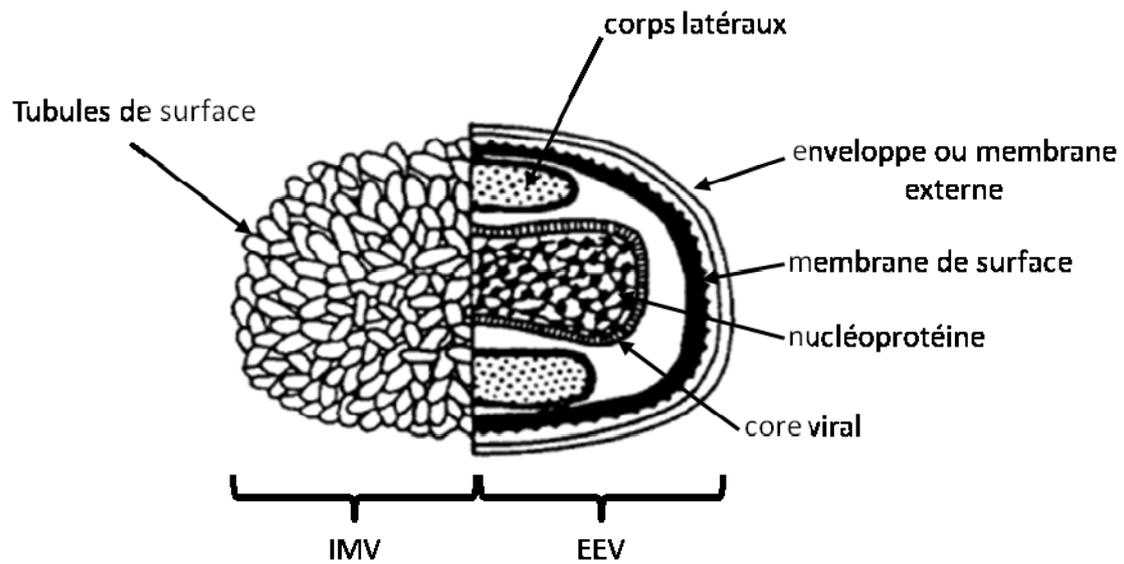
Huit genres composent la sous-famille des *Chordopoxvirinae* (338), parmi lesquels on trouve le genre *Orthopoxvirus* (**Tableau 2**) qui comprend des agents pathogènes importants pour l'homme, comme le virus de la variole, et des virus qui infectent l'homme de façon sporadique, comme le monkeypox virus ou le cowpoxvirus. Ce genre comprend également le virus de la vaccine (VACV), virus prototype de la famille des *Poxviridae*, qui a été utilisé à grande échelle pour vacciner l'homme contre la variole jusqu'à son éradication en 1980 (181). Le MYXV quant à lui, appartient au genre *Leporipoxvirus*.

### 2. Structure des virions

Les caractéristiques générales du MYXV étant identiques à celles de tous les poxvirus, on se basera donc sur celles du virus de la vaccine, en précisant ce qui est spécifique au MYXV. Les poxvirus font partie des plus gros et plus complexes virus animaux connus. Les virions sont de formes ovoïdes pouvant mesurer 400x300x200nm (243) et plus spécialement 300x250x200nm pour les leporipoxvirus (100, 338). Ils sont composés d'un core, d'un nombre variable de membranes ou enveloppes (**Figure 2**). Des structures supplémentaires situées dans les concavités du core ont aussi été décrites et sont appelées les "corps latéraux" (238, 344).

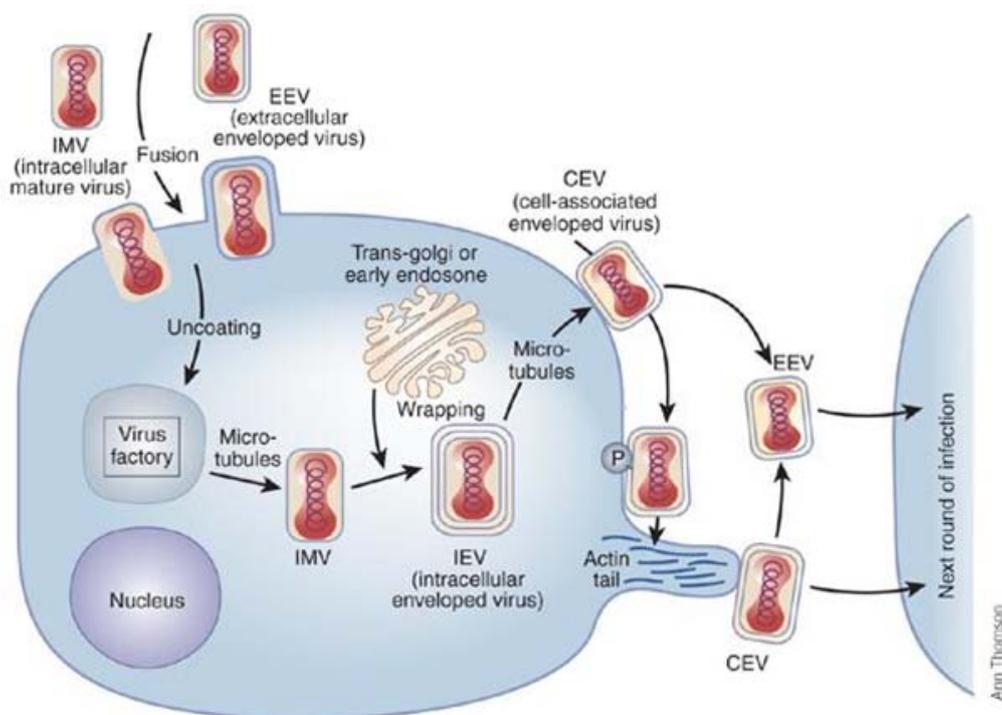
<b>Genre</b>	<b>Espèce types</b>	<b>Principales autres espèces</b>
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la vaccine (VACV)	Mouse pox (ectromélie) Cowpox virus Virus de la variole du buffle Virus de la variole du chameau Virus de la variole du singe Virus de la variole humaine
<i>Parapoxvirus</i>	Orf virus	Virus de l'ecthyma contagieux Virus de la stomatite papuleuse Pseudocowpox
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire (Fowlpox)	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la clavelée (Variole ovine)	Virus de la variole caprine Lumpy skin disease virus
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose (MYXV)	Virus du fibrome de Shope Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus du molluscum contagiosum	
<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapox virus de l'homme	Virus de la tumeur Yaba du singe

**Tableau 2:** Classification des *Chordopoxvirinae*. D'après Van Regenmortel et al. (2000) (338)



**Figure 2.** Représentation schématique des poxvirus (Van Regenmortel et al. (2000) (338)), forme intracellulaire (IMV), à gauche et extracellulaire (EEV) à droite.

Ces structures sont sujettes à controverse puisque certains pensent qu'il s'agirait d'artéfacts de microscopie électronique (85) alors que d'autres réfutent cette théorie (129). Mais des analyses en cryomicroscopie ont montré qu'ils avaient une réalité physique (66). La membrane de surface est une bicouche lipoprotéique classique de 5,0 à 5,5 nm d'épaisseur entourant le core et les corps latéraux. Sa composition lipidique et protéique (12 polypeptides dont au moins six sont exposés à sa surface externe) est différente de celle de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le virus de la vaccine se retrouve sous 4 formes virales (240) (**Figure 3**) que l'on peut distinguer selon la nature et le nombre d'enveloppes virales : les IMV (Virions Intracellulaires Matures), les EEV (Virions Extracellulaires Enveloppés), les CEV (Virions Enveloppés associés à la membrane de la Cellule) et les IEV (Virions Intracellulaires Enveloppés). Plus récemment, on parle de Mature Virus pour désigner les particules IMV, de Wrapped Virus pour les IEV et d'Extracellular Virus pour les EEV et CEV (61). L'existence de plusieurs formes virales a également été démontrée pour le MYXV (86). Les IMV et les EEV/CEV (61, 236, 300, 302, 304, 306) constituent les trois formes infectieuses. Les formes IMV représentent la très grande majorité de la progénie virale et restent séquestrées dans le cytoplasme de la cellule hôte jusqu'à la lyse cellulaire (61, 236, 300). De par sa résistance, cette forme permettrait le passage du virus d'un hôte à l'autre (301). Les formes EEV, quant à elles, se retrouvent dans le milieu extracellulaire avant la lyse cellulaire, après la sortie du virus de la cellule. Elles représentent 1% de la progénie virale (299) et possèdent une enveloppe supplémentaire (306) par rapport à la forme intracellulaire. Cette dernière caractéristique leur confère des propriétés singulières en terme de reconnaissance des cellules cibles (339), de protection vis-à-vis des anticorps neutralisants (153) et de capacité d'infection (190, 219, 303). Elles semblent plutôt responsables de la dissémination au sein de l'organisme (171). La membrane externe des EEV est fragile, ce qui pose des problèmes méthodologiques de purification, la rupture de l'enveloppe externe transformant les EEV en "IMV-like" (301).



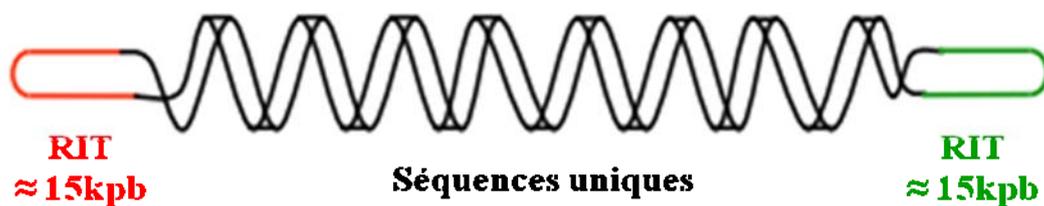
**Figure 3.** Représentation schématique des différentes formes virales de Poxviridae (modèle : VACV) (218). Au moins trois des formes virales du virus de la vaccine sont infectieuses (IMV, CEV et EEV). Les formes EEV et CEV semblent particulièrement cruciales pour la dissémination du virus vers les cellules hôtes voisines.

### 3. Organisation du génome

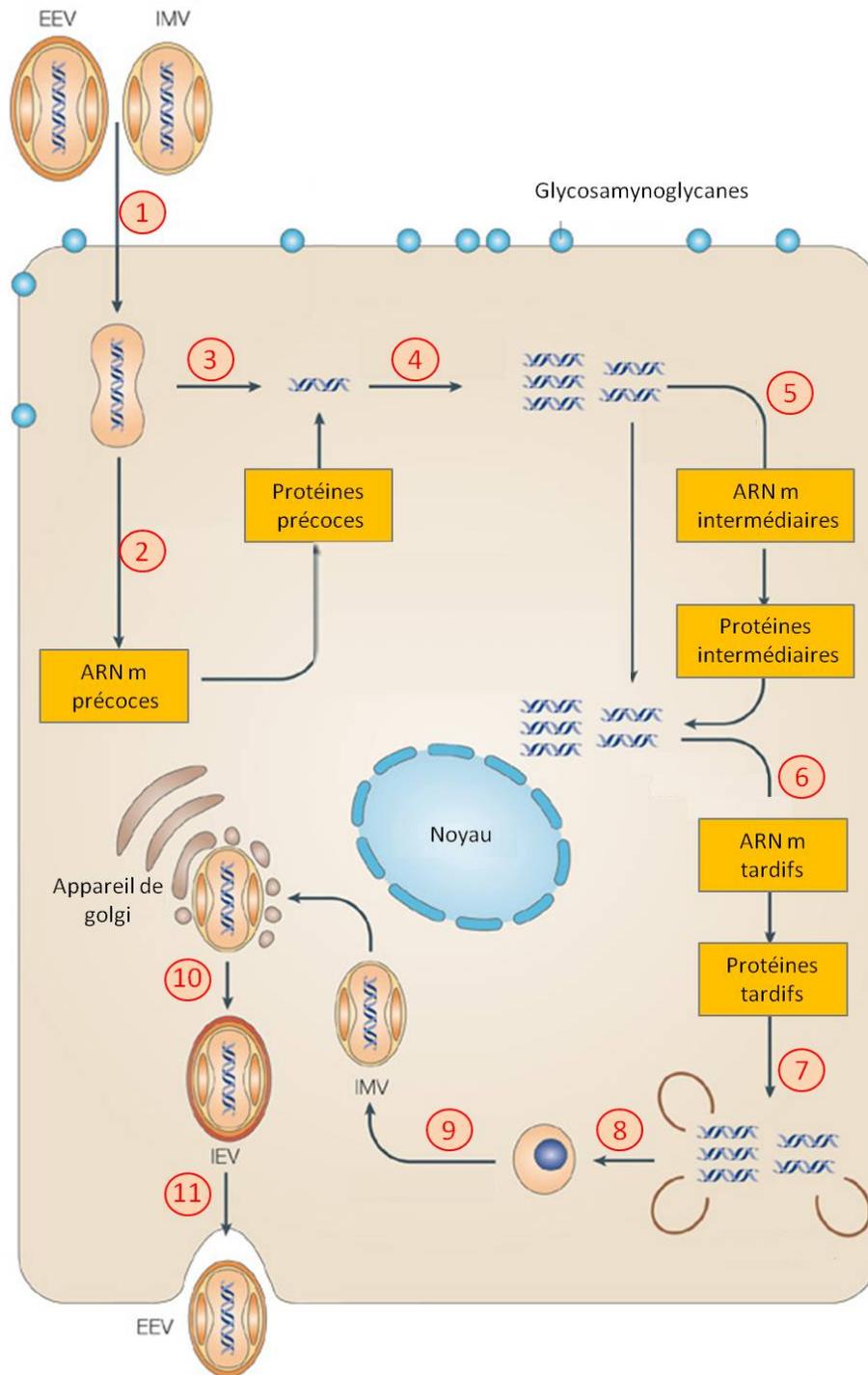
Le génome du MYXV est similaire à celui de tous les poxvirus. Le génome des poxvirus est constitué d'une molécule unique d'ADN bicaténaire, dont la taille varie de 130 à 375kpb ( $\approx$  162 pour le MYXV) (46, 238). Les deux brins à leurs extrémités sont reliés entre eux par des liaisons covalentes d'où un aspect d'épingle à cheveux (**Figure 4**). Le séquençage complet de poxvirus majeurs comme le VACV (122), le virus de la variole (214), le fowlpox (3), le MYXV souche Lausanne (46), a été réalisé. L'organisation du génome est commune à tous les poxvirus, elle comprend une zone centrale fortement conservée dans le genre, contenant des gènes essentiels pour le cycle viral, et des régions répétées inversées terminales (RIT) de 10 à 15kpb codant essentiellement pour des facteurs de pathogénicité (226, 259). Dans ce génome, il y a peu de séquences non codantes, pas d'introns, des séquences promotrices courtes, de nombreuses ORF de faible taille, ce qui explique la présence d'environ 200 gènes pour 162kb. L'existence de gènes non essentiels et la plasticité de la particule virale permettent l'insertion d'ADN étranger d'au moins 25kb, ce qui fait des poxvirus d'excellents vecteurs viraux.

### 4. Cycle viral

Le cycle de réplication des poxvirus est entièrement cytoplasmique et sa durée varie selon la nature du virus et l'origine de la cellule (de 12 à 24h pour le VACV) (41), pour le MYXV, il est d'environ 16h. Le cycle viral est composé de six étapes : l'entrée du virus dans la cellule, l'expression des gènes précoces, la réplication, l'expression des gènes intermédiaires et tardifs et enfin l'assemblage du virion et sa sortie de la cellule (**Figure 5**).



**Figure 4.** Représentation schématique du génome viral de Poxviridae (modèle : VACV). RIT : séquences Répétées Inversées Terminales (236). La région centrale comporte des gènes hautement conservés nécessaires à la réplication virale. Au niveau des RIT et dans les régions à proximité se trouvent essentiellement des gènes de pathogénicité.



**Figure 5.** Cycle de répliation (VACV). (1) entrée du virus et libération du core dans le cytoplasme, (2) transcription des gènes précoces, (3) déshabillage du core, (4) répliation de l'ADN et formation de concatémères, (5) transcription des gènes intermédiaires, (6) transcription des gènes tardifs, (7) début d'assemblage avec les premiers fragments de membrane, (8) incorporation d'ADN, (9) maturation et formation des IMV, (10) acquisition d'une double membrane (IEV) et migration vers la surface cellulaire à l'aide du cytosquelette, (11) fusion avec la membrane plasmique cellulaire et formation des CEV et libération d'EEV (adapté d'après Moss 2001 (236), MacFadden, 2005 (218))

#### 4.1. Entrée du virion dans la cellule hôte

L'existence de plusieurs formes virales infectieuses complique fortement cette étape. En effet plusieurs mécanismes d'entrée des poxvirus dans les cellules cibles ont été proposés (236, 237, 269). A ce jour, aucun récepteur cellulaire n'a été découvert pour illustrer la première phase de liaison du virion à la cellule.

Les formes IMV semblent se lier à la surface cellulaire via une interaction de certaines protéines virales avec les glycosaminoglycans (GAGS), bien que ces derniers ne semblent pas essentiels pour l'infection, et avec la lamine de la matrice extracellulaire (57, 58, 146, 193).

Après la liaison à la surface cellulaire, plusieurs voies d'entrée des IMV ont été proposées. Certains auteurs pensent que la pénétration virale pourrait s'effectuer par fusion directe (69, 70, 198, 289), cependant pour d'autres, la particule IMV ne serait pas internalisée dans sa totalité mais resterait à l'extérieur de la cellule (198). Il a été mis en évidence par microscopie électronique deux autres mécanismes d'entrée du virus par endocytose et par macropinocytose (49, 222). Quant aux EEV, les mécanismes d'entrée dans la cellule sont encore flous, certains auteurs pensent qu'elles pénétreraient par endocytose et seraient prises en charge par des vésicules intracellulaires. Le PH acide des vésicules induirait la rupture de l'enveloppe externe et le core serait libéré par fusion de la membrane des IMV avec celles des vésicules (153, 339). Pour d'autres auteurs, sur les bases d'observations en microscopie électronique, la membrane des EEV se romperait au contact de la membrane cellulaire, et resterait à l'extérieur de la cellule (189). La particule IMV, ainsi libérée, pénétrerait alors par fusion membranaire (49).

Concernant le MYXV, grâce à des observations en microscopie électronique, il semblerait que les EEV pénètrent dans la cellule cible par rupture préalable de l'enveloppe et des images d'endocytose et de macropinocytose ont également été observées (86).

## **4.2. Régulation de l'expression des gènes viraux**

Le cycle de réplication des poxvirus se déroule entièrement dans le cytoplasme, ce qui implique une autonomie quant au processus de réplication et de transcription. L'expression des gènes étant séquentielle, on distingue tout d'abord la transcription des gènes précoces avant la réplication du génome viral, puis la transcription des gènes intermédiaires, et tardifs. Les mécanismes de transcription semblent conservés au sein de la famille (40). Une même ARN polymérase à neuf sous-unités, est utilisée pour la transcription des trois types de gènes.

### **4.2.1. Expression des gènes précoces**

Dès l'entrée du virus dans la cellule, et avant même la décapsidation, la machinerie transcriptionnelle associée au virion est immédiatement activée, permettant ainsi la synthèse d'ARNm viraux précoces, coiffés et polyadénylés. Ces ARN viraux représentent 50% du génome (43). Les gènes précoces codent principalement pour des facteurs impliqués dans l'immunorégulation, la synthèse d'ARN et la réplication de l'ADN. Ils sont synthétisés au sein même du core viral, grâce à une enzyme de coiffage des ARNm, une poly(A) polymérase, d'une 2'-O-méthyltransférase et de toute la machinerie nécessaire à la synthèse d'ARN, présentes dans le core. Les transcrits s'échappent ensuite par des pores à la surface du core et sont traduits grâce aux ribosomes cellulaires.

Parmi les gènes exprimés précocement, on retrouve ceux codant pour les facteurs de transcription des gènes intermédiaires. La synthèse des protéines précoces permet la décapsidation et la libération du génome.

#### **4.2.2. Réplication du génome viral**

Le génome du virus se réplique de façon très autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée. L'ADN viral ne s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui l'enveloppent pour former un compartiment dans lequel la réplication s'initie (209). A un stade précoce du cycle, la boucle présente dans chaque télomère de l'ADN viral est rompue par une endonucléase spécifique présente dans le core viral. Les télomères poxviraux sont par analogie aux chromosomes eucaryotes, des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités de la molécule nucléaire de l'ADN viral. La réplication débute au niveau de sites précis du cytoplasme que l'on appelle des virosomes. C'est dans les télomères qu'a lieu, de toute évidence, l'initiation et la terminaison de la réplication (74).

#### **4.2.3. Expression des gènes intermédiaires et tardifs**

La réplication de l'ADN entraîne un profond changement dans l'expression des gènes poxviraux. En même temps, la synthèse des protéines hôtes est sévèrement diminuée. Il existe deux classes de protéines post-répliquatives : des protéines intermédiaires, détectées presque immédiatement après la réplication de l'ADN, et des protéines tardives qui apparaissent un peu plus tard. Les gènes intermédiaires et tardifs codent respectivement pour les acteurs de la transcription des gènes tardifs et précoces, ainsi que des protéines participant à la morphogénèse et l'assemblage des virions (273).

#### **4.3. Assemblage et maturation des virions**

Les premières étapes de formation des virions ont lieu dans des structures du cytoplasme appelées virosomes, zones dépourvues d'organites cellulaires. Ces enveloppes virales immatures en forme de croissant deviennent circulaires et matures par clivage protéolytique des protéines de capsid et condensation du core viral, produisant ainsi la première forme

infectieuse de virions, les IMV. Pour la majorité des virions, la morphogenèse s'arrête là, et les IMV sortent par lyse cellulaire. D'autres sont transportés, grâce aux microtubules (65), jusqu'à la périphérie de la cellule, où ils s'envelopperont d'une double membrane supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi ou d'endosomes, formant ainsi les IEV (6h post infection) (294). Ce déplacement fait appel à la polymérisation, l'utilisation des microtubules et à la destruction du centrosome (303). La membrane la plus externe peut alors fusionner avec la membrane plasmique, permettant l'expulsion des virus infectieux de type EEV, toujours minoritaires mais en quantité variable selon les souches virales et les CEV. Les CEV restent accolés à la membrane cellulaire puis sont expulsés par une microvillosité "actinique". Seulement 10 à 12 heures sont nécessaires au bon déroulement du cycle infectieux (à terme lytique), le virus de la vaccine produisant de la sorte 2000 à 3000 particules par cellule. De nombreuses protéines virales impliquées dans la morphogenèse et la libération des virions ont déjà été identifiées et d'autres sont découvertes régulièrement (132). Le virus est aussi capable de progresser de la cellule infectée vers plusieurs cellules voisines par fusion cellulaire et formation de syncytium.

### **C. Interactions poxvirus/ hôtes**

De façon générale, les poxvirus ont développé des stratégies complexes pour survivre en conditions défavorables et en particulier pour contourner les défenses mises en œuvre par leurs hôtes. Ces outils visent à optimiser la multiplication du virus et surtout à moduler la réponse immunitaire. Les modalités d'interaction entre les poxvirus et leurs hôtes vont moduler le tropisme viral selon trois niveaux :

- le tropisme au niveau cellulaire mettant en jeu un certain nombre de mécanismes/ interactions moléculaires qui peuvent expliquer le cycle permissif, semi-permissif ou abortif

d'un virus dans une cellule donnée. Il peut être influencé par des facteurs cellulaires mais aussi des facteurs viraux

- le tropisme au niveau tissulaire ou organique, intermédiaire entre les deux autres niveaux
- le tropisme d'hôte, influencé par les deux premiers niveaux et par la capacité du virus à contourner la réponse immunitaire de l'hôte. Il va déterminer la pathogénie, la diffusion virale dans l'organisme infecté et la dissémination entre les organismes en fonction des mécanismes élaborés par le virus pour échapper aux réponses de l'hôte (218).

Les poxvirus codent pour de nombreuses protéines qui interviennent à différents niveaux pour moduler la réponse immunitaire mise en place chez l'hôte. Dans le **tableau 3** sont présentés les facteurs impliqués dans les interactions du MYXV avec son hôte.

### **1. Tropisme cellulaire**

*In vivo*, les poxvirus possèdent un spectre d'hôte assez strict. Pourtant selon les conditions expérimentales, certaines cellules dérivées d'espèces non hôtes peuvent être permissives à l'infection *in vitro*. Par exemple, on peut observer que le MYXV, qui est spécifique du lapin, peut se répliquer *in vitro* dans des cellules transformées d'origine humaine ou simienne (320), ou encore dans des fibroblastes primaires d'origine bovine. Chaque poxvirus possède une spécificité *in vitro* distincte de son spectre d'hôte *in vivo* (**Tableau 4**).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Grand rôle	Protéine	Gène	Fonction/ propriétés
<b>Facteur d'hôte</b>	M062	M062R	Nécessaire pour la réplication dans les cellules de lapin, les cellules cancéreuses humaines, se lie à SAMD9
	M063	M063R	Nécessaire pour la réplication dans les cellules de lapin
	M064	M064R	Fonction liée à celle de M062
<b>Contrôle du cycle cellulaire</b>	MGF	M010L	Homologue du facteur de croissance EGF
<b>Contrôle de l'apoptose</b>	M-T2	M002L/R	Homologue du récepteur au TNF $\alpha$ ; inhibiteur des interactions TNF/TNFR, empêche l'apoptose des lymphocytes
	M-T4	M004L/R	Inhibition de la voie Bcl-2/caspases via son interaction avec la protéine BAP
	M-T5	M005L/R	Interaction avec Cullin-1 et Akt ; inhibition, arrêt du cycle cellulaire et apoptose
	M11L	M011L	Interaction avec les protéines pro-apoptotiques (Bak/Bax), inhibe l'apoptose
	M143	M143	Ubiquitine ligase avec une fonction possible anti-apoptotique
	M146R	M146R	Supposée se lier aux protéines Bcl-2 et inhiber la réponse innée via les TLR
	SERP-2	M151R	Inhibiteur de sérine protéase intracellulaire (granzyme B, ICE)
	M-T7	M007L/R	Homologue du récepteur aux IFN $\gamma$ , activité anti-inflammatoire
<b>Contrôle de la réponse IFNs</b>	M029L	M029L	Homologue d'E3L, fonction prédictive d'inhibition de la voie PKR
	M135R	M135R	Homologie avec B18R du VACV ; mécanisme précis d'interférence avec la réponse IFN encore inconnu
	M156R	M156R	Homologue du facteur eIF2- $\alpha$ , fonction possible dans l'inhibition de la voie PKR
	M-T1	M001L/R	Liaison avec les chemokines CC, inhibition du chimiotactisme
<b>Inhibition de la réponse inflammatoire</b>	SERP-1	M008.1L/R	Inhibiteur de sérine protéase sécrétée, activité anti-inflammatoire
	M13L	M013L	Inhibiteur de l'inflamasome (Caspase-1, IL-1 $\beta$ et IL-8)
	M104L	M104L	Supposé participer à l'inhibition de la voie de signalisation des récepteurs chémokines
	M128L	M128L	Homologue du CD47
	M141R	M141R	Homologue du CD200
	M144R	M144R	Homologue de C3L/B5V (VACV), interaction possible avec le complément, CD46-like
	SERP-3	M152R	Inhibiteur de sérine protéase
	MNF	M150R	Inhibiteur supposé de NF $\kappa$ B
<b>Inhibition de la présentation du CMH-I</b>	M-T4	M004L/R	Inhibition de la présentation du CMH-I via son interaction avec la protéine BAP
	MV-LAP	M153R	Scrapine, down-régule les molécules de surface CD4, Fas-CD95 et CMH-I

**Tableau 3.** Facteurs impliqués dans les interactions du MYXV avec son hôte

Genre	Virus	Hôtes réservoirs	Hôtes sensibles	Cellules permissives
<b>Molluscopoxvirus</b>	Molluscum Contagiosum	Homme	Homme, cheval	Kératocytes humains différenciés
<b>Orthopoxvirus</b>	Variole	Homme	Primates	La plupart des cellules de mammifères
	Monkey pox	Rongeurs, écureuil	Singe, homme	La plupart des cellules de mammifères sauf les cellules PEK
	Cowpox	rongeurs	Homme, vache, chat, renard, animaux de zoo	La plupart des cellules ce mammifères
	Vaccine	inconnu	Large spectre, incluant l'homme	La plupart des cellules de mammifères sauf les CHO
	Ectromelia	Rongeurs	Souris de laboratoire	La plupart des cellules de mammifères sauf les CHO
<b>Parapoxvirus</b>	ORF	Ruminants	Homme, chat, herbivores	Les fibroblastes primaires ovins et bovins
<b>Leporipoxvirus</b>	Virus de la myxomatose	Lapins américains	Lapin européen	Cellules de lapins, cellules de singes sélectionnées et les cellules de tumeurs humaines
<b>Yatapoxvirus</b>	Yatapoxvirus	Rongeurs ? Insectes ?	Homme, singe	Cellules de singes sélectionnées

**Tableau 4.** Exemples de spécificité *in vitro* et spectre d'hôte *in vivo* de certains poxvirus

### **1.1. Particularités du tropisme cellulaire des poxvirus**

Pour la plupart des virus, le tropisme cellulaire est essentiellement déterminé par l'interaction entre les protéines virales exposées et leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes, comme par exemple la présence de rafts lipidiques (59), de polysaccharides (237) ou de l'expression de certains récepteurs de surface (50, 95, 187). Concernant les poxvirus, aucun récepteur spécifique n'a été identifié, bien qu'une étude récente ait montré la présence d'un récepteur non identifié à la surface des lymphocytes T humains activés permettant la liaison avec le virus de la vaccine (50).

Ce sont en revanche des événements en aval des étapes d'attachement, d'entrée et même d'expression virale précoce qui influent spécifiquement sur le devenir du cycle viral (169).

### **1.2. Facteurs d'hôte**

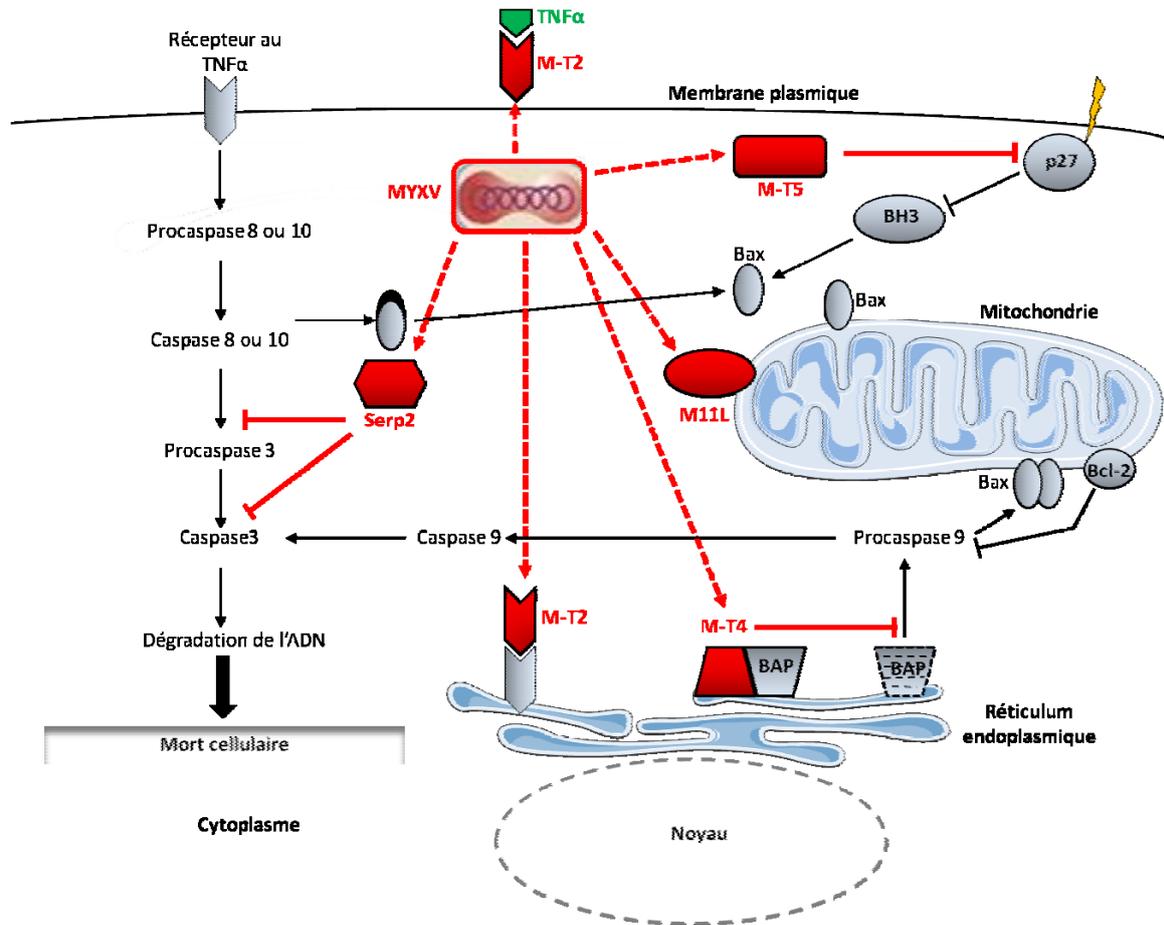
Il existe deux catégories de gènes sur le génome des poxvirus, les gènes conservés à travers les genres et essentiels à la réplication et à la morphogenèse, et les gènes non essentiels qui influencent le profil pathologique propre à chaque espèce virale, ce sont les gènes de virulence. Parmi les gènes de virulence, les gènes de spectre d'hôte sont ceux pour lesquels la délétion entraîne une modification du tropisme cellulaire. Par exemple, il a été découvert que les protéines M-T5, M-T2, M-T4 et M11L du MYXV pouvaient interférer avec les voies de signalisation intracellulaire. Récemment, il a été mis en évidence l'implication du gène M063R dans le tropisme d'hôte sans que le mécanisme exact ait été élucidé (14). Ce gène est essentiel pour la multiplication du MYXV dans les cellules de lapin et pour le développement de la myxomatose chez l'hôte naturel (14).

## 2. Contrôle du cycle cellulaire

De nombreux poxvirus expriment des facteurs de croissance mimant l'action de leurs homologues eucaryotes, les facteurs EGF (Epidermal growth factor) ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ces homologues, comme le VGF (Vaccina virus Growth Factor) du virus de la vaccine, le MGF (Myxoma Growth Factor) du MYXV ou encore le SFGF (Shope Fibroma virus Growth Factor) du virus du fibrome de Shope sont capables de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire (188) et de stimuler la mitose des cellules adjacentes. *In vivo*, le MGF est un facteur de virulence essentiel puisque la maladie est fortement atténuée lorsque des lapins sont inoculés avec un virus n'exprimant plus ce facteur de croissance (46).

## 3. Contrôle de l'apoptose

De nombreux organismes pluricellulaires utilisent comme mécanisme de défense cellulaire, la mort programmée des cellules ou apoptose, pour éliminer les cellules endommagées, mutées, âgées ou encore infectées, qui pourraient constituer une menace pour le reste de l'organisme. La voie de signalisation de l'apoptose peut être induite de façon intrinsèque et extrinsèque. La voie intrinsèque ou mitochondriale implique l'activation des facteurs de la famille Bcl-2, ce qui induit la libération soudaine et complète du cytochrome c des mitochondries dans le cytoplasme, entraînant à terme l'activation des caspases effectrices de l'apoptose. La voie extrinsèque ou des récepteurs de mort (famille des récepteurs du TNF (tumor necrosis factor)) fait intervenir le TNF et la voie des Fas-Fas ligand. Etant donné que l'apoptose peut avoir un effet négatif sur la réplication et la dissémination virale, de nombreux virus, y compris le MYXV ont développé de multiples stratégies pour contrôler ce processus. Une des stratégies consiste à inhiber directement des molécules clé pro-apoptotiques (**Figure 6 et Tableau 3**).



**Figure 6:** Mécanisme d'échappement du MYXV à l'apoptose. La protéine M-T2 sous sa forme sécrétée inhibe la fixation du TNF $\alpha$  à son récepteur le TNF $\alpha$ R. Sous sa forme cytoplasmique, elle semble avoir une fonction anti-apoptotique. M-T4 inhibe l'activité de la protéine BAP31, protéine réticulaire associée aux protéines Bcl2/Bxl et à la caspase-8. M-T5 inhibe l'apoptose en agissant sur le cycle cellulaire (p27). La protéine M11L est capable de se lier aux protéines mitochondriales Bak et Bax, inhibant leur activité pro-apoptotique.

## **4. Interférence avec le système immunitaire**

### **4.1. Réponse de l'hôte à l'infection**

La réponse de l'hôte face à une infection virale se déroule en trois phases : l'immunité constitutive et immédiate, une phase inductible précoce non spécifique de l'antigène puis une phase inductible dépendante des lymphocytes, spécifique de l'antigène, support d'une réponse effectrice et d'une mémoire immunologique. Les premières cellules à pénétrer le site primaire d'infection sont les cellules inflammatoires : d'abord les granulocytes neutrophiles, puis les cellules de la lignée monocyttaire (monocytes-macrophages). Les cellules inflammatoires limitent potentiellement la multiplication virale, en détruisant notamment les poxvirus en présence d'anticorps (183, 334).

Pour le MYXV, la mise en place de la réponse immunitaire débute avec l'infection des cellules dendritiques, cellules de Langerhans (dans le derme) (24, 182, 363) et des LT (au niveau des nœuds lymphatiques drainant).

L'infection par un poxvirus est associée à la présentation de nombreuses protéines qui suscitent la synthèse d'une grande variété d'anticorps : les anticorps neutralisants, dirigés contre les virions enveloppés ou non, les anticorps qui lysent les cellules infectées en association avec le complément et les anticorps qui se combinent aux antigènes circulants pour former des complexes immuns. Les lapins infectés développent des IgG et des IgM qui apparaissent insuffisantes pour leur protection. En effet, il a été montré que l'administration d'un sérum hyperimmun contre le MYXV à des lapins, suivie d'une épreuve virulente, n'a pas d'action sur la mortalité (mort de 17 lapins sur 20) (103). De plus, les vaccins à virus inactivés n'ont pas permis de protéger les lapins contre la myxomatose, alors même que des anticorps étaient produits (105), contrairement aux vaccins à virus atténués qui sont protecteurs. Ces données suggèrent que si des anticorps préexistants peuvent conférer une

relative protection durant la phase clinique, les anticorps développés au cours de l'infection ne peuvent assurer une protection totale des animaux. Ceci fait donc apparaître l'importance de la réponse à médiation cellulaire dans le contrôle de l'infection par le MYXV.

Il est clairement établi que les lymphocytes jouent un rôle déterminant dans la réponse anti-poxvirale, d'une part en régulant la production des anticorps (essentiellement LT CD4<sup>+</sup>) mais aussi et surtout en exerçant une activité cytotoxique directe à l'égard des cellules infectées (LT CD8<sup>+</sup>). Des LT spécifiques du virus mousepox sont détectables dès 2 jours post-infection (183). Des souris *nude* (CD4-, CD8-) ayant perdu leur capacité à développer une réponse à médiation cellulaire, sont incapables de contrôler la multiplication virale dans les organes cibles et meurent à des doses subléthales du virus de l'ectromélie (42). Lors d'une infection par un poxvirus, on observe un dysfonctionnement de la réponse des lymphocytes aux mitogènes. Ceci peut être associé en partie à une perturbation de l'expression de certaines molécules de présentation des antigènes telles que celles du CMH de classe I (15, 32).

Le MYXV possède des armes pouvant interférer avec les acteurs responsables de la mise en place de la réponse cellulaire. Il a été montré que le MYXV possédait une capacité de dérégulation des molécules de CMH-I à la surface des cellules infectées (60, 133, 210), pouvant ainsi altérer la capacité de présentation des antigènes aux cellules LT CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, Le MYXV est capable d'infecter les cellules dendritiques mais aussi les lymphocytes T, qui sont les cellules impliquées dans la réponse à médiation cellulaire (182). Il a été mis en évidence que le virus pouvait avoir un effet sur plusieurs protéines aux propriétés anti-inflammatoires, des inhibiteurs d'interférons, de chimiokines et cytokines, ce qui pourrait empêcher la mise en place d'une réponse immune à médiation cellulaire efficace (312).

Tous ces éléments indiquent que la réponse à médiation cellulaire est très certainement la composante majeure du contrôle immunitaire de l'infection du lapin européen par le MYXV.

## 4.2. Interférence avec les IFN

La voie des IFN semble jouer un rôle clé dans le tropisme du MYXV. En effet, des études ont montré que l'infection des fibroblastes primaires murins est bloquée par la cascade de signalisation Erk-IGN-STAT1, et que l'inactivation du facteur Erk ou de la signalisation médiée par le facteur de transcription STAT-1, lève le blocage et rend les fibroblastes primaires permissifs à l'infection (348). Il en est de même pour les fibroblastes humains primaires, *in vitro*. L'infection de ces cellules par le MYXV semble être dépendante de la réponse cellulaire aux IFN, puisque l'augmentation de la production d'IFN induit une diminution de la permissivité des cellules ainsi que le nombre de passages en culture (170).

Il existe deux principaux types d'IFN, les IFN de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) et l'IFN de type II (IFN- $\gamma$ ). Les IFN de type I sont synthétisés par la plupart des cellules de l'organisme, l'IFN $\alpha$  étant principalement produit par les leucocytes et l'IFN- $\beta$  par les fibroblastes. L'infection virale induit la synthèse d'IFN de type I ainsi que de nombreuses cytokines.

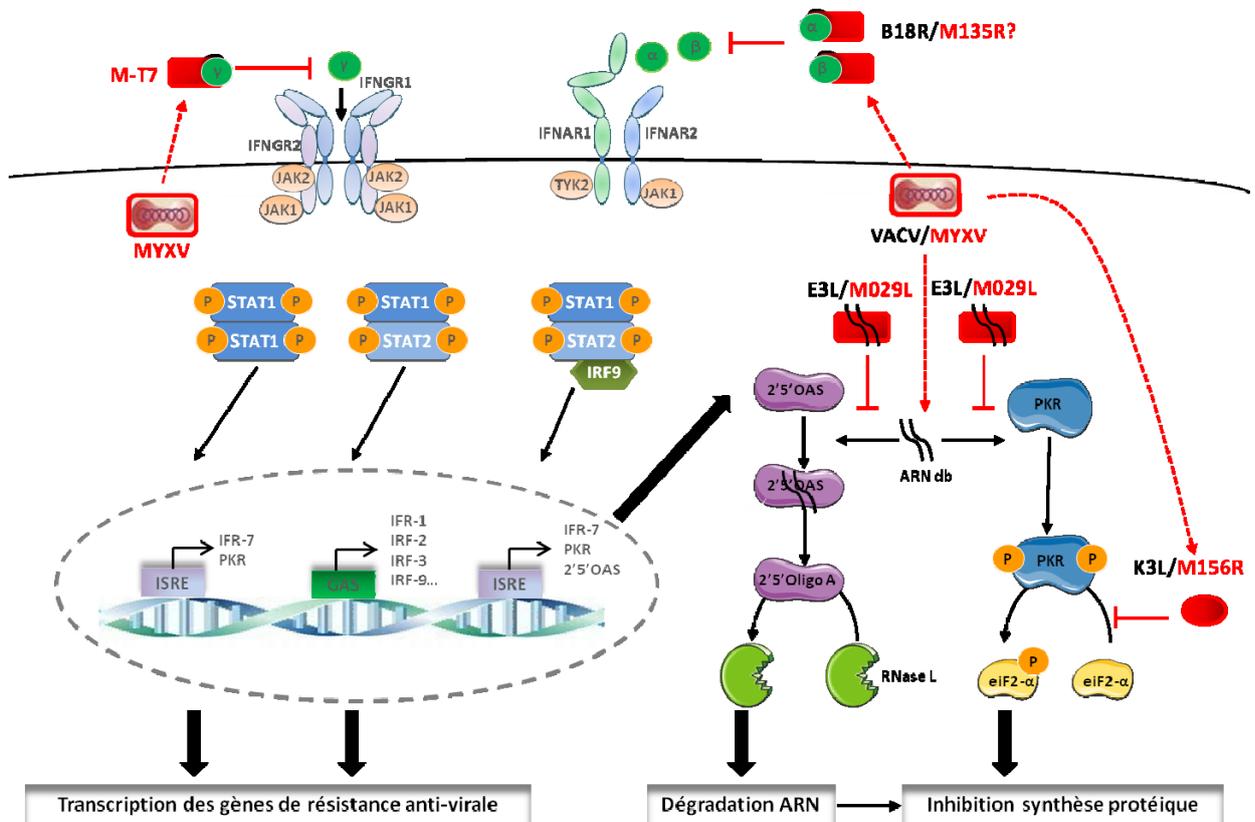
L'IFN $\gamma$  intervient dans le développement de la réponse immunitaire adaptative. Il est sécrété par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après présentation d'antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques (360).

L'entrée d'un pathogène dans un organisme provoque une réponse immédiate innée conduisant dans la majorité des cas au contrôle de l'infection et à l'élimination du pathogène. L'immunité innée antivirale repose en grande partie sur la synthèse et la sécrétion des interférons de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) par les cellules infectées, qui induisent un état antiviral dans les cellules environnantes via l'expression de nombreuses protéines possédant une activité antivirale ou immunomodulatrice. L'amplitude de la réponse antivirale déclenchée par l'IFN- $\alpha$  contraint la quasi-totalité des virus à s'adapter en élaborant diverses stratégies d'échappement aux effecteurs des voies d'activation des interférons. Dans le cas des poxvirus, ces stratégies incluent des inhibiteurs de l'induction, des récepteurs qui miment des ligands,

des phosphatases qui bloquent la cascade STAT-1 de transduction du signal ou encore des inhibiteurs d'effecteurs tels que la protéine kinase R (180, 288, 296, 297) (**Figure 7** et **Tableau 3**).

### **4.3. Inhibition de la réponse inflammatoire**

Suite à une agression par un agent pathogène, l'organisme met en place une première ligne de défense grâce à l'action de nombreuses molécules pro-inflammatoires, les cytokines. Mais de même que pour l'apoptose ou la voie des IFN, les poxvirus ont mis en place de nombreux facteurs pour encore une fois contourner la réponse immunitaire, comme M-T1, SERP-1, SERP-3, MNF et M13L chez le MYXV (**Tableau 3**).



**Figure 7.** Inhibition de la voie des IFN par le MYXV. Le facteur soluble M-T7 du MYXV (homologue B8R du VACV) va inhiber l'activation de la voie IFN $\gamma$ . Il va aussi inhiber la transcription de certains gènes impliqués dans la réponse anti-virale. Le facteur B18R du VACV fait de même avec les IFN $\alpha/\beta$ , et malgré son homologie avec B18R, cela n'a pas été démontré pour la protéine M135R. La protéine E3L (homologue M029L de MYXV) inhibe les voies antivirales de la PKR et de la 2'5'OS, en se liant à l'ARNdb produit lors de la répllication virale. Le facteur M156R (Homologue de K3L du VACV) mime l'action du facteur de transcription eIF2- $\alpha$  et inhibe son activation en se liant à la PKR à sa place

## II. Les poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux

Les poxvirus recombinants sont utilisés dans de nombreux domaines de recherche (109, 118, 123-125, 300, 307, 310, 311) mais le principal domaine d'application reste leur usage en tant que vecteur vaccinal. Ce dernier a pris un essor considérable ces dernières années grâce au développement de nouvelles stratégies qui consistent à optimiser leur pouvoir immunogène via la stimulation d'une réponse immunitaire de type Th1 conduisant à une prolifération de lymphocytes T cytotoxiques capables d'éliminer l'agent infectieux. En effet, les vaccins classiques contenant des souches atténuées ou inactivées, présentent certains inconvénients limitant leur utilisation. Tout d'abord, les souches atténuées présentent un risque de réversion de leur pathogénicité initiale et pour certaines, un pouvoir pathogène résiduel non négligeable. Par ailleurs ces souches atténuées se multiplient dans l'hôte et sont susceptibles d'être transmises à des hôtes non vaccinés. Les vaccins à agents inactivés sont généralement moins immunogènes et induisent plutôt une réponse humorale. Ainsi, afin de remédier aux limites de ces vaccins, de nouvelles stratégies vaccinales ont été développées. Parmi celles-ci, l'utilisation de poxvirus recombinants a fait l'objet de nombreuses études car ce sont des virus aisément manipulables, capables d'exprimer de nombreux transgènes et d'induire une forte réponse immunitaire, à la fois humorale et cellulaire, contre le produit d'un transgène d'intérêt (23, 217, 253, 347). Le virus de la vaccine a fait l'objet de nombreuses études en tant que vecteur vaccinal à la fois chez l'homme et chez les animaux. De nombreux gènes issus de micro-organismes variés (virus de l'hépatite B, de la rage, de la fièvre aphteuse, de la grippe, du VIH...) y ont été introduits à des fins vaccinales (19, 141, 350). Beaucoup d'autres poxvirus sont également utilisés comme vecteurs vaccinaux, dans de nombreuses espèces animales. Tout l'enjeu actuel est de combiner l'efficacité et la sécurité d'emploi du vecteur vaccinal.

## **A. Les bases du choix du poxvirus**

Leur grande taille, et leur spécificité d'hôte ont fait des poxvirus en général des vecteurs vaccinaux de choix. Selon l'application que l'on envisage, il peut être intéressant de choisir tel ou tel poxvirus dans un contexte multiplicatif (vecteurs réplicatifs) ou non (vecteurs non réplicatifs).

### **1. Vecteurs poxviraux réplicatifs**

#### **1.1. Virus de la vaccine**

Les vecteurs réplicatifs, sont en général des vecteurs capables de se multiplier chez l'individu à vacciner en dépit de la présence d'un gène étranger intégré à leur génome. C'est le cas typique du VACV, le premier poxvirus utilisé comme vecteur vaccinal chez les mammifères, il y a une trentaine d'années après son emploi massif pour l'éradication de la variole (351). En effet, ce virus présente plusieurs avantages de par sa facilité de production, de purification et sa capacité à induire une immunité humorale et cellulaire contre un antigène d'intérêt. De plus, il existe à l'heure actuelle, de nombreux plasmides adaptés à l'insertion de gènes étrangers dans différentes régions du génome du VACV. Par ailleurs, il est aisé d'obtenir des titres élevés de ce virus et il est facile de le purifier contrairement à d'autres poxvirus. Cependant ce virus présente certains risques biologiques, comme celui d'une infection accidentelle du manipulateur ou d'autres personnes à son contact. Au cours de la campagne de vaccination contre la variole, de nombreux accidents post-vaccinaux avec des troubles neurologiques importants, voire des décès ont été observés et des infections accidentelles avec des virus recombinants, bien que bénignes, ont été rapportées (283). Aujourd'hui le VACV, dont l'origine est inconnue et sans réservoir naturel connu, peut être considéré comme un virus de laboratoire. Néanmoins, des épidémies ont eu lieu au Brésil depuis 1999, avec

l'apparition de variants de VACV, circulant chez le bétail et l'homme; les rongeurs pourraient jouer, dans cette situation, un rôle épidémiologique déterminant (2). Le VACV possède un spectre d'infection large, ce qui peut représenter un avantage lors d'études préliminaires sur animaux de laboratoire. Néanmoins, ce large spectre constitue un inconvénient en termes de sécurité de manipulation et d'innocuité pour l'Homme ou pour d'autres espèces.

Par ailleurs, une utilisation chez l'animal d'un virus potentiellement pathogène pour l'Homme demeure risquée et elle est déconseillée, même si la sécurité d'emploi a été nettement améliorée, avec en particulier la construction de souches répliquatives mais atténuées, par délétion de gènes cibles du VACV (81). Ainsi, le très large spectre d'hôte du VACV représente également une contrainte puisque la transmission d'une espèce cible à une espèce non cible et une possible recombinaison avec un autre Poxvirus, sont possibles (255).

## **1.2. Autres poxvirus**

Tout poxvirus à spectre d'hôte étroit utilisé comme vecteur vaccinal chez son hôte naturel peut être considéré comme vecteur répliquatif. C'est le cas pour le MYXV pour lequel l'utilisation d'un vaccin recombiné MYXV-RHDV (virus de la maladie hémorragique virale du lapin) a permis de vacciner simultanément les lapins européens contre la myxomatose et la maladie hémorragique virale du lapin. De même, l'utilisation de *Capripoxvirus* recombinant a permis de protéger les ruminants non seulement pour des capripoxviroses, mais aussi de la peste bovine ou de la peste des petits ruminants (20, 80, 272).

## 2. Les vecteurs poxviraux non réplicatifs

Bien que leur efficacité ait été largement prouvée, l'utilisation de vecteurs poxviraux réplicatifs rencontre des problèmes de biosécurité. En effet, il n'est pas souhaitable que des virus recombinants puissent diffuser d'animal à animal. Ainsi l'utilisation de vecteurs poxviraux non réplicatifs, ne pouvant se répliquer chez l'animal, a vu le jour.

### 2.1. MVA et NYVAC

Pour éviter tout incident, des souches atténuées du VACV ont été développées, c'est le cas par exemple d'une souche non répliquative du virus de la vaccine, le MVA (Modified VACV strain Ankara). Ce virus a été obtenu par atténuation de la souche Ankara par passages successifs sur cellules d'embryons de poulet. Le MVA est délété pour une vingtaine de gènes, d'autres gènes viraux sont incomplets et certains possèdent des mutations ponctuelles. Cette souche est non répliquative dans quasiment toutes les lignées cellulaires mammifères, à l'exception de la lignée BHK-21 (une lignée de cellules de reins de hamster) et une lignée de cellules de singes MA104. Elle n'est pas pathogène pour les animaux immunodéprimés comme c'est le cas pour d'autres souches du virus de la vaccine. Cependant, il n'est pas forcément le poxvirus de choix, puisqu'il n'est pas capable de réaliser certaines glycosylations importantes qui ont lieu dans les cellules infectées avec une souche classique du virus de la vaccine (290). Une autre souche atténuée dérivée du virus de la vaccine a été mise au point. Il s'agit de la souche NYVAC, obtenue par délétion ciblée de 18 gènes non essentiels à la culture *in vitro*. Les produits de ces gènes sont connus pour être impliqués dans le pouvoir pathogène (thymidine kinase, ribonucléotide réductase...) ou encore le spectre d'hôte (K1L, C7L). Cette souche est capable de se multiplier sur cellules Vero mais pas sur cellules humaines et présente une forte atténuation lors d'essais *in vivo*. Il existe une autre souche dérivée du virus de la vaccine pour laquelle seul le gène D4R est absent. Cette souche

a été obtenue grâce à une lignée cellulaire trans-complémentant la protéine virale D4R. Le gène D4R code pour une uracile ADN glycosylase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN. Cette activité n'est pas essentielle au cycle viral, et la nécessité d'utiliser une lignée transcomplémentante indique que cette protéine possède une ou plusieurs autres fonctions encore inconnues qui sont nécessaires au cycle viral. En plus de son caractère déficient attractif, cette souche présente des propriétés similaires au MVA pour la vaccination (249).

## **2.2. Les Avipoxvirus chez les mammifères**

Le genre *Avipoxvirus* se compose de virus qui infectent toutes les espèces de volailles et de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages. Les *Avipoxvirus* ont une grande spécificité d'hôte et sont incapables de réaliser un cycle de réplication complet chez des espèces non aviaires. Les souches sauvages peuvent causer des maladies très graves chez leurs hôtes naturels. Certains *Avipoxvirus* peuvent infecter d'autres espèces que leur espèce cible, mais ceci se produit sans conséquences pathologiques. Par exemple, le *Pigeonpox virus* (PGPV) (Poxvirus du pigeon) est naturellement atténué pour le poulet et il a pu être utilisé dans un vaccin recombinant contre la grippe aviaire. Ainsi, des souches atténuées d'*Avipoxvirus* peuvent être utilisées pour vacciner des oiseaux (255). Bien que leur multiplication soit limitée aux espèces aviaires, ces souches atténuées d'*Avipoxvirus* sont apparues comme des vecteurs efficaces et très sûrs pour les mammifères.

En effet, il a été montré que l'infection de cellules de mammifères avec un vecteur recombinant issu d'*Avipoxvirus* aboutit à l'expression du gène étranger et induit une immunité protectrice. Ainsi, une immunisation peut être réalisée en l'absence de réplication du vecteur, ce qui annihile le potentiel de dissémination du vecteur chez l'animal vacciné et évite par là même, la dissémination du vecteur aux animaux non vaccinés ou à l'environnement en

général. Aucune dissémination de l'infection à partir des animaux vaccinés n'est donc à craindre (325). De plus, l'utilisation de ces vecteurs dans des espèces qui ne sont pas des espèces réservoirs d'*Avipoxvirus* rend la probabilité de recombinaison *in vivo* quasiment nulle.

Ces dix dernières années, un grand nombre de virus recombinants ont été produits en utilisant la souche atténuée ALVAC du *Canaripoxvirus* (CNPV). Ces essais ont démontré l'efficacité et l'innocuité de ce vecteur (131, 326). Ainsi, un vaccin recombinant a été produit avec un vecteur CNPV dans le génome duquel une portion du gène *env* codant pour une glycoprotéine gp70 du *Feline leukemia virus* (FeLV) (virus de la leucose féline) et le gène *gag* (codant pour une polyprotéine de capsid) ont été insérés. *In vivo*, l'expression de l'antigène protecteur du FeLV entraîne une forte réaction immunitaire, qui est particulièrement adaptée à la stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, et qui semble jouer un rôle majeur dans la guérison naturelle de l'infection et dans l'immunité vaccinale (326). La vaccination avec le vaccin recombinant CNPV-FeLV permet l'expression d'antigènes viraux immunogènes de la même manière que l'infection naturelle peut le faire, sans réplication virale productive (131). C'est un vaccin efficace, qui allie efficacité et innocuité. Il s'agit du premier vaccin recombinant efficace contre un Rétrovirus.

La capacité à induire une protection vis-à-vis d'une épreuve par voie mucosale a également été observée pour d'autres vaccins recombinants utilisant un *Avipoxvirus* comme vecteur (vaccin contre la maladie de Carré ou encore du vaccin contre la grippe équine) (326).

### **2.3. Exemples d'autres virus : le MYXV**

Un essai de vaccination fondé sur l'utilisation d'un recombinant MYXV, exprimant une protéine de capsid du calcivirus félin (FCV) sous la dépendance de promoteurs artificiels précoces et tardifs, a été réalisé avec succès chez le chat contre la calcivirose féline (216,

217). Le MYXV est incapable de se répliquer de manière productive dans les cellules de chat *in vitro*; néanmoins les cellules infectées avec le virus recombiné expriment les antigènes hétérologues. Les chats immunisés avec ce vaccin ont produit des anticorps neutralisants en grande quantité et ont été chroniquement protégés après infection d'épreuve par le FCV sauvage. De plus aucune transmission du virus recombiné MYXV-FCV des chats vaccinés aux non vaccinés n'a été mise en évidence. Ces résultats démontrent le potentiel du MYXV comme vecteur vaccinal non répliatif.

### **3. Les avantages des vecteurs poxviraux**

En bilan, les poxvirus se sont avérés être des outils très appréciés dans le développement de vecteurs vaccinaux, car ils présentent de nombreuses caractéristiques très avantageuses. Comme nous l'avons vu précédemment, la réplication des poxvirus est strictement cytoplasmique, ce qui empêche l'intégration de séquences d'ADN étranger dans le génome de la cellule infectée, conférant ainsi une sécurité d'emploi non négligeable.

Dans le cytoplasme les poxvirus possèdent leur propre machinerie de transcription et sont quasi autonomes. Sous le contrôle d'un promoteur poxviral d'intérêt le gène choisi sera correctement transcrit par les ARN polymérase virales et l'ARNm sera ensuite pris en charge par la machinerie cellulaire de traduction. Les promoteurs poxviraux ont une structure bien conservée et sont donc interchangeables. De plus des promoteurs synthétiques efficaces peuvent être utilisés. Ainsi, il est possible de décider du moment et du niveau d'expression du gène par le choix d'un promoteur précoce, intermédiaire ou tardif. Une séquence d'ADN couramment utilisée comme promoteur, contient en tandem un promoteur précoce et un promoteur tardif, permettant un niveau d'expression continu et modéré du gène étranger (235). Par ailleurs, contrairement aux systèmes d'expression procaryotes ou aux vecteurs baculovirus, les modifications post-traductionnelles de la protéine recombinante sont très

proches de celles de la protéine native en système poxvirus, et son activité est en général parfaitement conservée (145).

Les poxvirus possèdent un génome viral flexible et de grande taille, qui peut intégrer des fragments d'ADN étrangers de grande taille par recombinaison homologue ainsi que la délétion de gènes non essentiels (254).

L'innocuité des vecteurs poxviraux est en général bien connue. Certains d'entre eux, surtout le VACV, ont été mondialement utilisés avec succès dans des campagnes de vaccination. Bien que quelques complications post-vaccinales aient été décrites, le VACV reste très sûr et efficace. Il a permis l'éradication mondiale de la variole.

Sur un plan pratique, les poxvirus se multiplient facilement, sont stables et supportent bien la congélation, la lyophilisation et la réhydratation sans perte importante du titre infectieux. Cela les rend particulièrement adaptés à la vaccination de masse. Les poxvirus peuvent être administrés par voie intradermique, méthode classique d'inoculation, par voie sous-cutanée, voire intramusculaire et certains peuvent également être administrés par voie orale (28). Enfin, il est possible de les utiliser en Santé Animale dans le cadre d'une stratégie DIVA car leur utilisation permet de distinguer les réponses immunitaires après une infection naturelle de celle induite par la vaccination. Pour cela il suffit de disposer de deux tests de diagnostic, un permettant de détecter la réponse sérologique contre l'antigène contenu dans le vecteur et l'autre permettant de détecter la réponse sérologique contre un antigène viral non contenu dans le vecteur. Ainsi dans des situations de très faible prévalence d'une maladie, il est possible d'envisager l'élimination physique des animaux infectés sans toucher aux animaux vaccinés (257).

#### 4. Les limites des poxvirus

Les vecteurs poxviraux utilisés pour la vaccination sont à base de virus vivants et de ce fait, ils finissent fatalement par détruire les cellules infectées. Ils ne peuvent donc être utilisés que pour l'expression transitoire d'antigènes.

Au sein du genre, les membres de la famille des *Poxviridae* présentent des similitudes antigéniques. Ceci pose problème lors d'une vaccination réalisée avec un vecteur poxvirus homologue. En effet, cette pré-immunité limitera la capacité du virus entrant à atteindre et à infecter le tissu cible ; par conséquent cela diminue l'expression de l'antigène étranger et donc la réponse immunitaire générée contre l'antigène cible. Pour contourner ce problème, il est possible d'utiliser des combinaisons différentes de vecteurs ou de diversifier les voies d'immunisation.

Le problème majeur, notamment pour la vaccination chez l'homme, est le pouvoir pathogène résiduel, qui peut limiter leur emploi en tant que vecteurs vaccinaux. La solution réside dans l'utilisation de poxvirus à spectre d'hôte étroit ou la maîtrise des facteurs de pathogénicité et l'exploitation de souches totalement apathogènes du VACV (81, 227, 257).

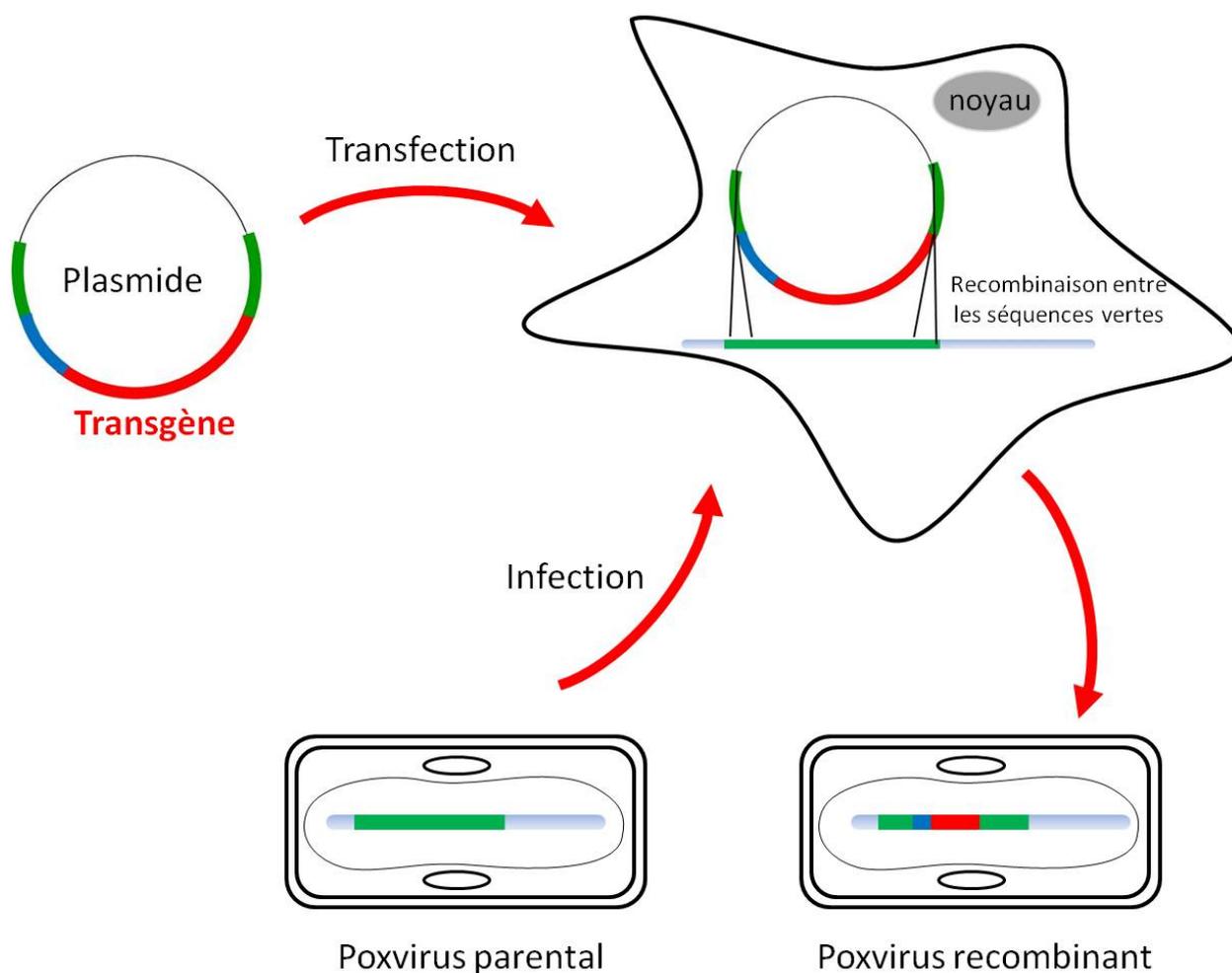
Par ailleurs, pour les vecteurs non réplicatifs, le niveau d'expression de l'antigène chez l'animal est limité et l'induction d'une réponse immunitaire protectrice est quelquefois difficile à atteindre.

## A. Modalités de constructions des poxvirus recombinant

Plusieurs méthodes sont actuellement disponibles pour obtenir des poxvirus recombinants. Leur construction implique le choix d'un promoteur poxviral pour le gène étranger à exprimer, d'un marqueur de sélection pour différencier les virus recombinants des virus sauvages, et du site d'insertion des séquences d'ADN d'intérêt.

### 1. Schéma général pour l'obtention d'un poxvirus recombinant

La méthode la plus répandue pour l'obtention de poxvirus recombinés consiste à infecter/transfecter des cellules avec le poxvirus d'intérêt et un plasmide de transfert (**Figure 8**). Ce plasmide de transfert contient le gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur poxviral encadré par deux séquences clonées du génome du poxvirus qui correspondent à la région génomique que l'on souhaite interrompre. Le plasmide isolé puis amplifié dans *Escherichia Coli* est ensuite transfecté dans des cellules animales préalablement infectées par le poxvirus sauvage. Lorsqu'une cellule est à la fois infectée et transfectée, les régions d'ADN identiques (en l'occurrence les fragments d'ADN poxviraux clonés dans le plasmide de transfert et présents sur le génome viral) peuvent recombiner entre elles de façon à générer un génome viral ayant intégré l'ensemble de l'ADN étranger. Un double crossing-over de part et d'autre de l'ADN étranger est donc nécessaire pour la production de ce nouveau génome viral. Ces événements de recombinaison, et a fortiori deux, étant rares, il est donc nécessaire d'insérer en même temps que l'ADN étranger d'intérêt soit une cassette de sélection soit un gène marqueur afin d'isoler le poxvirus recombiné.



**Figure 8:** Principe de construction d'un vecteur recombinant par recombinaison. En rouge : transgène, en bleu : le promoteur du transgène et en vert : gènes du poxvirus parental.

## **2. Construction des plasmides vecteurs d'insertion**

### **2.1. Choix du promoteur**

Il est fondé sur le fait que l'ARN polymérase ADN dépendante du virus de la vaccine ne reconnaît que des promoteurs issus de poxvirus. Comme nous l'avons vu précédemment trois types de promoteurs ont été décrits (239) : précoce, intermédiaire, tardif. En fonction de ce que l'on compte faire du virus recombinant, le choix du promoteur sera différent. Ainsi pour un niveau d'expression élevé, l'utilisation des promoteurs dérivés de gènes tardifs codant pour des protéines majeures de structure de la particule virale (52, 270) ou des promoteurs dérivés d'autres poxvirus (258) sera conseillée. L'un des promoteurs les plus couramment utilisés est le p.7.5 (203). Il s'agit d'un promoteur dit "précoce-tardif" du virus de la vaccine qui permet une expression continue pendant tout le cycle viral.

### **2.2. Site d'insertion d'ADN étranger**

Une très grande variété de sites d'insertion ont été mis en évidence (203), beaucoup d'entre eux sont proches des terminaisons génomiques, principalement parce que les gènes qui y sont situés sont non essentiels au cycle viral. Les régions centrales du génome des poxvirus sont beaucoup plus conservées et contiennent de nombreux gènes essentiels à la réplication virale. Néanmoins, là aussi, quelques gènes non essentiels ont été identifiés et utilisés comme sites d'insertion.

### **2.2.1. Insertion intergénique**

Comme son nom l'indique, cette stratégie consiste à intégrer le ou les gènes d'intérêt au niveau d'une zone intergénique évitant ainsi que les caractéristiques initiales du virus ne soient modifiés. Etant donné que le MYXV ne possède que très peu de régions non codantes et non régulatrices, cette stratégie n'est pas facilement applicable dans la construction d'un virus myxomateux recombinant. Ces régions contiennent notamment les promoteurs ou les terminateurs de transcription (46).

### **2.2.2. Insertion dans un gène ou un locus non essentiel**

Il s'agit de la stratégie la plus couramment utilisée et qui consiste à insérer l'ADN étranger dans un site non essentiel à la réplication virale. De nombreux sites d'insertion ont été mis en évidence et sont généralement localisés proches des terminaisons génomiques (203). Chez le virus de la vaccine près de 55 ORFs du génome du virus ont pu être délétées sans perte d'infectiosité (261). Cette insertion qui n'est pas essentielle pour la réplication virale *in vitro*, peut cependant influencer la pathogénicité *in vivo* et renforcer l'innocuité du vecteur viral. L'immunogénicité quant à elle reste souvent presque identique (191, 203). Deux sites d'insertion sont couramment utilisés pour le MYXV, la thymidine kinase (TK) et les loci MGF/M11L.

Le choix du locus TK présente plusieurs avantages car il s'agit d'un gène non essentiel au cycle viral, il est très conservé parmi les poxvirus et de plus un système de sélection basé sur l'absence d'expression de la TK a été développé (202, 203). La TK semble jouer un rôle important lors de l'infection *in vivo*. En effet des études sur le virus de la vaccine TK- ont montré une atténuation du pouvoir pathogène lors d'infection de souris Balb/CByJ (44). Concernant la TK du MYXV, l'influence de la délétion sur l'expression du pouvoir pathogène

*in vivo* n'a pas encore été étudiée de façon précise, mais l'inactivation de la TK du MYXV de souche Toulouse 1 se manifeste par une diminution du taux de létalité (22).

Deux ORF chevauchantes M10L (MGF pour Myxoma Growth Factor) et M11L constituent le double locus MGF/M11L du génome du MYXV. Les deux produits de ces gènes sont non essentiels à la réplication virale, mais par contre la délétion de l'un des deux gènes, et a fortiori des deux à la fois, provoque une diminution importante de la virulence chez le lapin (250). Les caractéristiques moléculaires de la protéine M11L et son rôle dans le contrôle de l'apoptose, ont déjà été présentés. Quant à la protéine MGF, il s'agit de l'homologue de l'EGF cellulaire (Epidermal Growth Factor) qui joue un rôle dans la régulation, la prolifération et la différenciation cellulaire (188). Plusieurs homologues poxviraux ont été identifiés : le VGF chez le VACV, le VaGF pour le virus de la variole, le SFGF pour le virus du fibrome de Shope et bien sûr le MGF chez le MYXV (39, 53, 336).

### **2.2.3. Insertion dans un gène essentiel**

Cette stratégie consiste à insérer de l'ADN étranger dans un gène essentiel, ce qui conduit à la génération d'un vecteur non-répliquatif strict impliquant un défaut de production virale même *in vitro*. Afin de remédier à cela, une complémentation en *trans* est nécessaire et impose la génération d'une lignée cellulaire produisant la protéine déficitaire. Cette stratégie est rarement utilisée en vaccination fondée sur les vecteurs poxviraux du fait des difficultés techniques et les caractéristiques de tropisme et de spectre d'hôte de certains poxvirus.

### **2.2.4. Fusion avec une protéine virale**

Cette stratégie a pour but d'augmenter le niveau de la réponse immunitaire, et consiste en l'incorporation d'un antigène étranger au niveau de la particule virale (11, 179). Elle a déjà fait ses preuves dans d'autres systèmes (7, 98, 185, 335). Pour les poxvirus, les seules études

*in vivo* réalisées à ce jour concernent des virus de la vaccine recombinés exprimant des antigènes du HIV-1 fusionnés à la protéine B5R des virions EEV. Il a ainsi été montré qu'une meilleure réponse immunitaire spécifique du produit du transgène, à la fois humorale et cellulaire CD4+, s'instaurait (179, 186). Cette stratégie a permis de conférer une protection partielle contre une épreuve hétérologue sur un modèle souris (186).

### 2.3. Sélection des virus recombinants

Le rendement spontané des recombinaisons étant très faible (moins de 1%), il est nécessaire d'utiliser des méthodes de sélection ou d'identification des virus recombinants. Les stratégies employées sont diverses, en voici quelques exemples.

Quelle que soit la méthode de sélection utilisée, les gènes employés sont aussi soumis à la "loi poxvirale", à savoir ils seront mis sous contrôle d'un promoteur poxviral. La sélection des virus recombinants peut être directement donnée par la résistance à l'acide mycophénolique (E. co gpt) ou encore la résistance à la généticine. D'autres gènes marqueurs permettent la visualisation directe des plages de lyse contenant le virus recombiné : production de  $\beta$ -galactosidase (gène LacZ, coloration bleue), production de  $\beta$ -glucuronidase (gène gus, coloration bleue) ou encore détection par la production de protéines fluorescentes telles que la GFP (Green Fluorescent Protein) ou le DsRed. D'autres méthodes peuvent être utilisées, en particulier celles reposant sur la sélection basée sur l'absence de la TK (Thymidine Kinase) (202, 203). La TK est capable de phosphoryler le 5-bromodeoxyuridine (BUdR), qui devient toxique pour la cellule. Ce système de sélection nécessite la génération d'une lignée cellulaire TK-, puisque la TK cellulaire est elle aussi capable de phosphoryler le BUdR. Ainsi, lors d'infection de cellules TK-, les virus TK+ (souche sauvage) rendront les cellules sensibles au BUdR, tandis que les virus recombinés TK- pourront se répliquer.

## **B. Evaluation des poxvirus en tant que vecteur vaccinal**

Un bon vecteur vaccinal, est un vecteur qui doit avoir le meilleur compromis entre immunogénicité et innocuité. En effet, il doit être capable d'induire une réponse immunitaire efficace pour protéger contre la maladie à long terme sans être dangereux pour l'animal, l'utilisateur et l'environnement qui l'entourent. Cette immunogénicité est dépendante non seulement du mode de délivrance des antigènes dans l'organisme, de la nature des antigènes mais surtout la qualité de présentation de ces antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux effecteurs de la réponse immunitaire. L'infection par un pathogène induit des changements fonctionnels dans les CPA. Ces changements fonctionnels sont essentiels pour la polarisation de la réponse immune adaptative (83). Ainsi une meilleure compréhension de ces modifications notamment l'expression de cytokines, chimiokines et molécules de costimulation à la surface de ces cellules, pourrait s'avérer utile pour évaluer l'efficacité d'un candidat vaccin. C'est pourquoi depuis quelques années, de nombreuses études sont menées afin de mieux comprendre les interactions entre de nouveaux candidats vaccins basés sur l'utilisation des poxvirus et les cellules dendritiques, CPA par excellence.

### **1. Interactions entre les cellules présentatrice d'antigènes et les vecteurs poxvirus.**

Les CPA sont représentées par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Les cellules dendritiques sont dites cellules présentatrices d'antigènes "professionnelles" car ce sont les seules qui soient capables d'activer les lymphocytes T naïfs, c'est-à-dire d'initier la réponse adaptative vis-à-vis des antigènes qu'elles présentent. Ainsi, elles jouent un rôle primordial dans la mise en place de la réponse immunitaire, à la fois innée et adaptative.

### **1.1. Activation des cellules dendritiques (Figure 9)**

Les cellules dendritiques présentes dans les tissus lymphoïdes sont de loin les plus capables d'activer les cellules T naïves; elles partagent avec les macrophages, la capacité à reconnaître et à capturer les pathogènes par phagocytose ou macropinocytose grâce à des récepteurs spécifiques aux agents pathogènes (PRR). Ces récepteurs dont les récepteurs TLR, NLR et CLR reconnaissent des structures communes aux agents microbiens. Les cellules de Langerhans de la peau sont des DC immatures typiques. Elles ont une forte activité phagocytaire et sont reconnaissables par la présence de grands granules appelés granules de Birbeck.

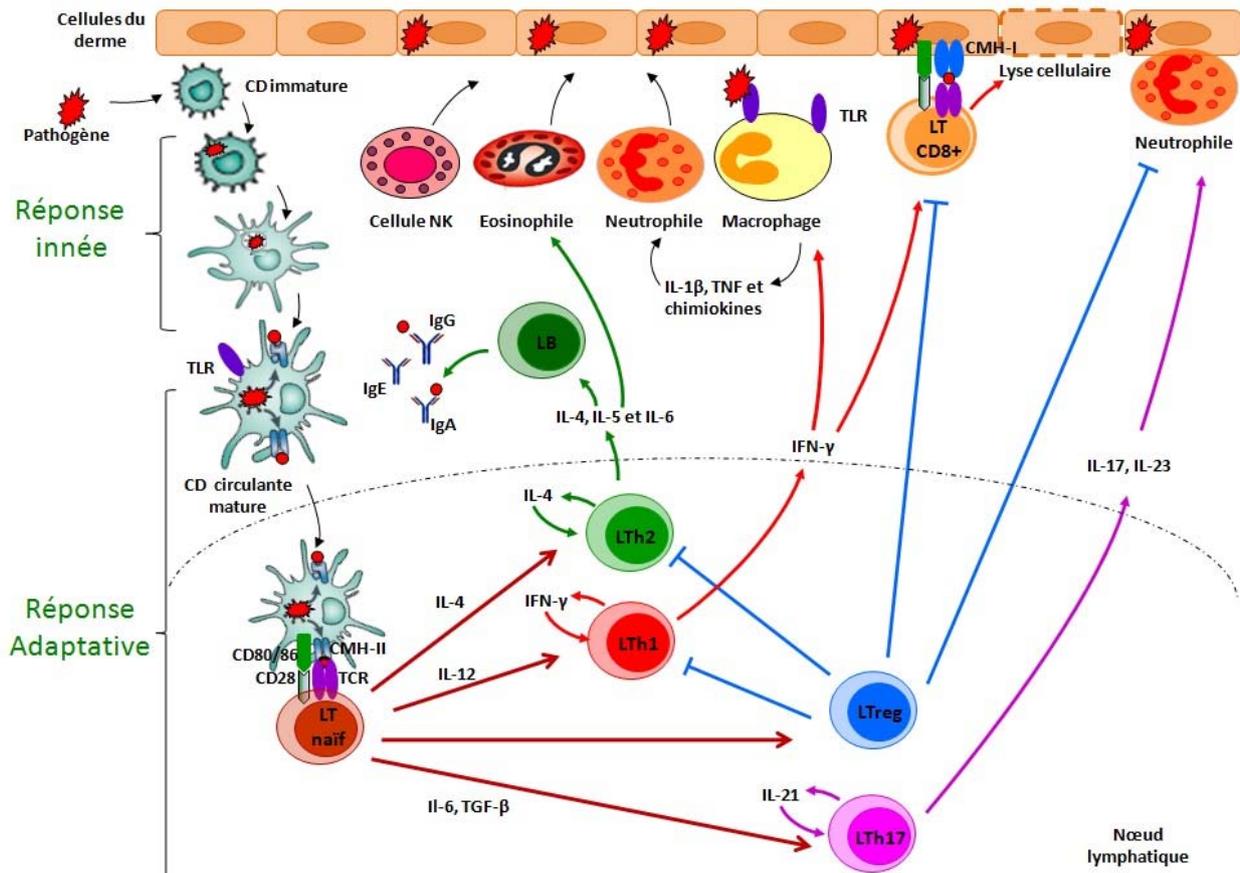
A la suite d'une infection cutanée par un agent pathogène, les cellules dendritiques immatures présentes dans l'épiderme et le derme, ainsi que les autres cellules de l'immunité innée (cellules épithéliales, neutrophiles, Natural Killer (NK), monocytes/macrophages) reconnaissent et capturent les antigènes. Ces derniers vont être dégradés en peptides et seront présentés grâce aux molécules du CMH I ou II à la surface cellulaire. Suite à ce processus d'apprêtement de l'antigène, les cellules dendritiques vont être activées et produire des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, telles que l'IL-2, le TNF- $\alpha$ , l'IL1 $\beta$ , l'IL-6, qui sont capables d'induire le recrutement et l'activation des différents acteurs de la réponse innée. Les cellules dendritiques activées migrent par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux nœuds lymphatiques. Au cours de cette migration, les cellules dendritiques subissent un processus de maturation, caractérisé par la modification de l'expression de différentes molécules de surface (CMH II, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86) et deviennent des cellules présentatrices d'antigène capables d'activer les lymphocytes naïfs et donc d'induire la réponse adaptative. A ce stade, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en plusieurs sous populations de lymphocytes à activité effectrice Th1 (helper), Th2 et Th17, et Threg (régulatrices). Ces différentes populations se caractérisent par leur profil de sécrétion

cytokinique qui leur permet d'orchestrer la réponse immunitaire face à différents pathogènes (234).

## **1.2. Polarisation de la réponse immune par les cellules dendritiques (Figure 9)**

### **1.2.1. Th1**

La polarisation de la réponse vers le phénotype Th1 est caractérisée par la sécrétion d'IL12, induite par la liaison entre le CD40 ligand à la surface des lymphocytes et la molécule CD40 à la surface des cellules dendritiques. Les lymphocytes T CD4 Th1 ainsi générés, sont capables de produire l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et du TNF- $\beta$ . Ces cellules induisent les réponses immunes cellulaires les plus efficaces contre des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries et parasites intracellulaires). L'IFN $\gamma$  est la cytokine caractéristique des Th1, il permet l'activation des macrophages et augmente ainsi leur activité phagocytaire, l'expression du CMH-I et II, l'induction d'IL-12, de NO (nitric Oxide) et la production d'anion superoxide, importants pour l'élimination des pathogènes intracellulaires (177, 247). Il favorise la production d'IgG qui en se fixant aux Fc $\gamma$ -récepteur et au complément entraîne l'opsonisation et la phagocytose de certains pathogènes (305, 314). Les Th1 sont aussi responsables de la réaction d'hypersensibilité retardée où l'IFN $\gamma$  et le TNF- $\beta$  induisent une forte inflammation et des lésions tissulaires. De plus, les Th1 peuvent acquérir des capacités cytolytiques suite à l'expression de FasL à leur surface. Les cytokines qu'ils produisent comme l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  vont promouvoir la différenciation des lymphocytes T CD8 en cellules cytotoxiques actives, appelées CTL pour "cytotoxic T lymphocytes", dont la fonction principale est de provoquer la mort par apoptose de leurs cibles spécifiques. Pour cela, les CTL possèdent plusieurs mécanismes distincts: le système Fas/FasL, et le système perforine/granzyme qui est le plus utilisé (284).



**Figure 9.** Rôles de DC dans la réponse immunitaire innée et adaptative (adapté d'après Abbas, et Mills (1, 229)). Les effecteurs de la réponse immunitaire innée ; macrophages, DC, neutrophiles, les cellules NK, ainsi que les protéines du complément constituent la première ligne de défense contre l'invasion par des microorganismes. La liaison des épitopes conservés des pathogènes aux PRR (pattern-recognition receptors) active la production de molécules pro-inflammatoires et de chimiokines qui vont permettre le recrutement des cellules effectrices au niveau du site d'infection. Les DC activées vont présenter les antigènes aux LT et promouvoir la division et la différenciation des LT CD4 naïfs. En présence d'IL-12, d'IL-4, ou d'IL-6/TGF-β, les LT CD4 naïfs vont se différencier en lymphocytes Th1, Th2, Th17 respectivement. Les Th1 sécrètent de l'IFN-γ, qui active l'activité anti-microbienne des macrophages et la production d'anticorps IgG2a, alors que les cellules Th2 vont induire la production d'anticorps par les LB d'IgG1, IgA et IgE. Les LT CD8<sup>+</sup> lysent les cellules hôtes infectées par des virus, des bactéries intracellulaires ou des parasites. La plupart de ces réponses peuvent causer des dommages tissulaires. Les Th17, eux vont sécréter IL-17 et IL-23, cytokines jouant un rôle dans le recrutement des neutrophiles au niveau des sites d'infection. Les Treg, quant à eux aident à contrôler les fonctions des différents effecteurs et les dommages associés aux tissus de l'hôte.

Lorsqu'un CTL est en contact direct avec la cellule cible qu'il a reconnue, il relâche les granules de perforine et de granzyme B stockés dans des vésicules dans le cytoplasme. Les molécules de perforine forment des pores qui d'une part permettent l'entrée des molécules de granzyme B dans le cytoplasme de la cellule cible, et d'autre part permettent une lyse osmotique. Les molécules de granzyme B induisent l'apoptose de la cellule cible par la voie des caspases. L'engagement de Fas et de son ligand FasL, induit un signal intracellulaire qui provoque l'activation des caspases et induit l'apoptose de la cellule cible. Les cellules T CD8 participent aux réponses contre les virus, les bactéries à développement intracellulaire, les tumeurs ou encore les greffes allogéniques ou xénogéniques. Les lymphocytes T CD8 ont besoin de l'aide des lymphocytes T CD4 pour être efficacement activés par les CPA, notamment pour promouvoir la différenciation des T CD8 en cellules mémoires (26, 352).

### **1.2.2. Th2**

A l'inverse, la polarisation Th2, qui se développe plutôt en réponse à des pathogènes extracellulaires et les métazoaires, se caractérise par une perte rapide de l'expression du récepteur de l'IL-12 par les lymphocytes T. Cette différenciation en lymphocytes Th2 est en partie due à l'action de l'IL-4, produite essentiellement par les lymphocytes CD4 eux-mêmes. Suite à l'activation et la différenciation en lymphocytes auxiliaires de type 2, ceux-ci expriment la molécule CD40 ligand, et sont alors capables d'interagir avec les lymphocytes B qui expriment la molécule CD40, induisant ainsi l'initiation de la réponse humorale et la commutation isotypique des immunoglobulines. Les lymphocytes Th2 sécrètent de nombreuses cytokines telles qu'IL-5, -6, -9, -10, -13 et -15. L'IL-5 est la principale cytokine responsable de la différenciation, de l'activation et du recrutement des éosinophiles. Quant à l'IL-13, elle est, comme l'IL-4, importante pour stimuler la croissance et la différenciation des

lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE. Mais les lymphocytes Th2 peuvent aussi être à l'origine de maladies allergiques (271).

### **1.2.3. Th17**

Récemment, une troisième sous-population effectrice de lymphocytes T CD4 producteurs d'IL-17 a été découverte, les Th17 (25, 184). La polarisation de la réponse vers le phénotype Th17 est caractérisée par la sécrétion d'IL6 et de TGF- $\beta$ . Cette population joue un rôle dans l'élimination de certains pathogènes spécifiques qui requièrent une inflammation massive et que les Th1 et Th2 ne peuvent pas contrôler. Les Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17 (IL-17A), d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22. La cinétique d'apparition des lymphocytes Th17 sur le site de l'inflammation est rapide. Grâce à l'induction de nombreuses chimiokines, les lymphocytes Th17 peuvent relier l'immunité innée et adaptative et attirer d'autres sous-populations T auxiliaires sur le site de l'inflammation. L'IL-17 et l'IL-17F sont des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines stimulent les fibroblastes, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, à produire de multiples médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , l'oxyde nitrique, des métalloprotéases et des chimiokines. Toutes ces molécules conduisent à l'induction d'une inflammation (111). Ces cytokines sont aussi responsables du recrutement de neutrophiles, eux-mêmes producteurs d'IL-17 (108).

### **1.2.4. Th reg**

Les Treg sont générés dans le thymus puis rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (286). Ils existent deux type de Treg, naturels (Treg) et inductibles (TCD8<sup>+</sup>reg, TCD4<sup>+</sup>reg (cellules T<sub>H3</sub> et T<sub>R1</sub>), qui semblent jouer un rôle complémentaire dans le contrôle de la réponse immune. Les Treg ont la capacité de migrer dans les sites d'inflammation ou au niveau des tumeurs (18). Les lymphocytes T régulateurs participent à la tolérance immunitaire

en régulant les lymphocytes T effecteurs par leur action immunosuppressive. Ils sont essentiels pour la tolérance aux antigènes du soi, et aux antigènes non dangereux. Les lymphocytes Treg ne sécrètent pas d'IL-2 et prolifèrent peu lorsqu'ils sont activés par leur TCR suite à leur rencontre avec leur antigène, par contre ils inhibent les réponses des autres lymphocytes T CD4 et CD8, les réponses des LT effecteurs ou les font rentrer en apoptose, par différents mécanismes encore mal connus (343).

### **1.3. Exemples d'interactions cellules dendritiques/poxvirus**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'infection par un agent pathogène induit des changements fonctionnels dans les CPA. Ces changements sont essentiels pour la polarisation de la réponse adaptative (83). Ainsi une meilleure compréhension de ces modifications notamment l'expression de cytokines, chimiokines et molécules de costimulation à la surface de ces cellules, pourrait être prédictif de l'efficacité d'un candidat vaccin. C'est pourquoi depuis quelques années, de nombreuses études sont menées afin de mieux comprendre les interactions entre de nouveaux candidats vaccins basés sur l'utilisation des poxvirus et les cellules dendritiques, CPA par excellence.

Yates et al., en 2007, ont montré que l'infection des cellules dendritiques matures par un VACV pouvait conduire à la génération d'une réponse LT CD8 (358). Dans une autre étude, il a été montré que VACV était capable d'infecter à la fois les cellules dendritiques de type CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup>, avec un pic d'infection à 6h. Cette infection a pour effet d'augmenter l'expression des molécules de costimulation et la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques. La sécrétion d'IL-12 serait dépendante de MyD88, pour les cellules dendritiques CD8<sup>+</sup> uniquement (357). D'autres études ont montré qu'en présence de peptides hautement immunogènes du VACV (D8L, D13L, H3L), les cellules dendritiques s'activent et sécrètent IL-12p70, IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6 et IFN $\gamma$ . La sécrétion d'IFN $\gamma$  a permis l'activation de LT avec

une augmentation du nombre de LT mémoires (4). Par ailleurs, il a été montré que le MVA était capable d'activer les DC (dérivées de monocytes humains), puisqu'une augmentation de l'expression des molécules de costimulation et des cytokines pro-inflammatoires a été observée après infection (83). Ces études ont été confirmées plus tard par Liu et al, en 2008 (195) et Tao et al, en 2010 (324). Liu et al, ont montré que le MVA infectait préférentiellement les cellules dendritiques et ces dernières devenaient matures et produisaient de l'IFN $\alpha$ , 18h après l'infection. Au bout de 12h d'infection, les cellules mourraient par apoptose. Les corps apoptotiques qui en résultent, étaient ensuite phagocytés par les cellules dendritiques non infectées qui par une présentation directe ou croisée des antigènes, étaient impliquées dans la génération d'une réponse LT CD8 spécifique (195). En revanche d'autres études ont montré que les cellules dendritiques (humaines) infectées par le MVA ne devenaient pas matures, même après inactivation du virus aux UV. L'induction de la mort des cellules dendritiques par apoptose a aussi été observée suite à l'infection par le MVA (178).

Pour les *Avipoxvirus*, il a été montré que les cellules dendritiques de primates (dérivées de monocytes) étaient les plus sensibles à la souche ALVAC de CNPV et que ce virus induisait leur mort par apoptose. Les corps apoptotiques qui en résultent sont pris en charge par les cellules dendritiques non infectées qui à leur tour vont devenir plus matures et capables d'initier une réponse T, sous l'influence du TNF $\alpha$  (154). Ces données ont été confirmées par la suite lors d'essais cliniques avec un ALVAC recombinant qui exprimait un antigène du HIV dans des cellules dendritiques humaines (211). Une étude du profil d'expression génique de cellules dendritiques humaines (dérivées des monocytes) a aussi été entreprise, et a mis en évidence que l'infection par ALVAC induisait l'expression de CXCL10, PKR, MX, ISG15, OAS, ainsi que des gènes impliqués dans la voie de signalisation de IRF7, STAT1, RIG-1, et MDA-5 (137).

Concernant le MYXV, une seule étude d'interactions entre le MYXV et des cellules dendritiques a été menée (67). En effet l'infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) primaires murines par le MYXV induit la production d'IFN $\alpha$ , - $\beta$ , TNF, IL-12p70. Il a été aussi montré que l'induction de la réponse innée suite à l'infection par le MYXV, nécessitait l'expression de TLR9 en même temps que celles de MyD88, IRF5, IRF7, et IFN de type I. Il semblerait que l'induction de l'IFN et IL-12p70 soit dépendante de PI3K et d'AKT. Par ailleurs le rôle de M029 (orthologue d'E3 du virus de la vaccine) dans l'inhibition de la production de cytokine par les DCp a été mis en évidence (67).

## **2. Evaluation de l'efficacité des vecteurs poxviraux via des essais vaccinaux.**

Afin d'évaluer la capacité d'un vecteur poxvirus à induire ou non une protection clinique et virologique contre une maladie donnée, des essais vaccinaux sont nécessaires. Ils peuvent être réalisés en modèle animal ou chez l'hôte naturel, lorsqu'il s'agit de maladies animales. Le principe repose sur une immunisation d'un lot, le suivi de la réponse immunitaire puis la réalisation d'une inoculation d'épreuve par rapport à un lot non immunisé. Le but est alors d'évaluer une protection clinique et virologique chez les animaux immunisés. La validation de cette protection va dépendre de plusieurs facteurs : la qualité de l'immunisation, notamment la nature et la dose de l'antigène inoculé, le mode d'administration, le nombre d'injections, et la qualité de l'inoculation d'épreuve, notamment la virulence de la souche inoculée, qui doit permettre de reproduire les paramètres observés lors d'infection naturelle.

Depuis de nombreuses années, plusieurs poxvirus ont été évalués comme candidat vaccin dans le but de développer des vaccins contre diverses maladies infectieuses (**Tableau 5**) mais aussi contre le cancer (109, 143, 230).

Chez les ruminants, plusieurs poxvirus ont déjà été testés comme vecteurs vaccinaux notamment lors d'essais vaccinaux contre la fièvre catarrhale ovine (262, 346).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Vecteur	maladies cibles	Modèles animaux	Recombinants	Antigène	Réponse immunitaire	Efficacité	Références
<i>Virus de la vaccine</i>	rage	Souris	MVA-RG	RG (glycoprotéine de la rage)	Ac neutralisants	Protection	(350)
		Souris	NYVAC-RG	RG	ND	Protection	(326)
	Virus de l'hépatite C	Souris transgénique HLA-1	MVA-HCV TG4040	NS3, NS4, NS5B	Réponse cellulaire CD4+, CD8+	Protection croisée	(114)
	Virus SARS	Singe rhésus	MVA-S	S (glycoprotéine spike)	Ac neutralisants	Protection	(54)
	Rougeole	Macaques	MVA-FH	F (protéine de fusion) H (hemaglutine)	Ac neutralisants CTL	Protection	(316)
	CMV	Souris	MVA-gB600	gB (glycoprotéine soluble)	Ac neutralisants CTL	ND	(349)
	Influenza	Souris	MVA-HA-NP	HA et NP (H1N1)	Réponse anticorps CTL	Protection	(19)
		Cochons	NYVAC-HA	HA (H5N1)	Réponse anticorps	Protection	(141)
<i>Capripoxvirus</i>	Peste bovine et dermatose nodulaire contagieuse	Bovins	reCap-F	F	-	Protection	(272)
	Peste des petits ruminants	Bovins	reCap-PPR/F	F	ND	Protection	(20)
	Virus de la fièvre vallée du rift (RVFV)	Souris	LSDV-G1-G2	G (glycoprotéine)	Ac neutralisants	Protection	(347)
<i>Canaripoxvirus</i>	HIV	Singes	ALVAC-HIV-2	Gp125	Acs neutralisants	Protection	(8)
	CMV	Humains	ALVAC-gB	gB	Ac neutralisants Réponse cellulaire	ND	(21)
	FeLV	Chats	CNPV-FL	gag, pol	Ac neutralisants	Protection	(326)
	Rage	Humains	ALVAC-RG	RG	Ac neutralisants	Protection	(45)
	EIV	Chevaux	CNPV-HA	HA (H3N8)	Réponse cellulaire Réponse humorale	Protection partielle	(253)
<i>Myxoma virus</i>	RHDV (virus de la fièvre hémorragique du lapin)	Lapins	SG33-VP60	VP60 (protéine de la capsid)	Ac neutralisants	Protection	(23)
	FCV (virus de la calcivirose féline)	Chats	MYXV-F9	F9 (protéine de la capsid)	Ac neutralisants	Protection	(217)
		Chats	MYXV-F9-LS015	F9 LS015 (protéines de la capsid)	Ac neutralisants	Protection	(216)

**Tableau 5 :** Exemples d'essais vaccinaux avec des poxvirus recombinés contre des maladies virales (adapté d'après Gomez et al (125))

### **III. La fièvre catarrhale ovine ou Bluetongue**

La Fièvre Catarrhale ovine (FCO), ou maladie de la langue bleue ou bluetongue (BT), est une arbovirose virale qui touche toutes les espèces de ruminants. Elle est due au virus bluetongue (BTV), un orbivirus de la famille des *Reoviridae*, qui se transmet par piqûre de diptères hématophages appartenant au genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae). Le BTV comprend classiquement 24 sérotypes.

#### **A. Généralités**

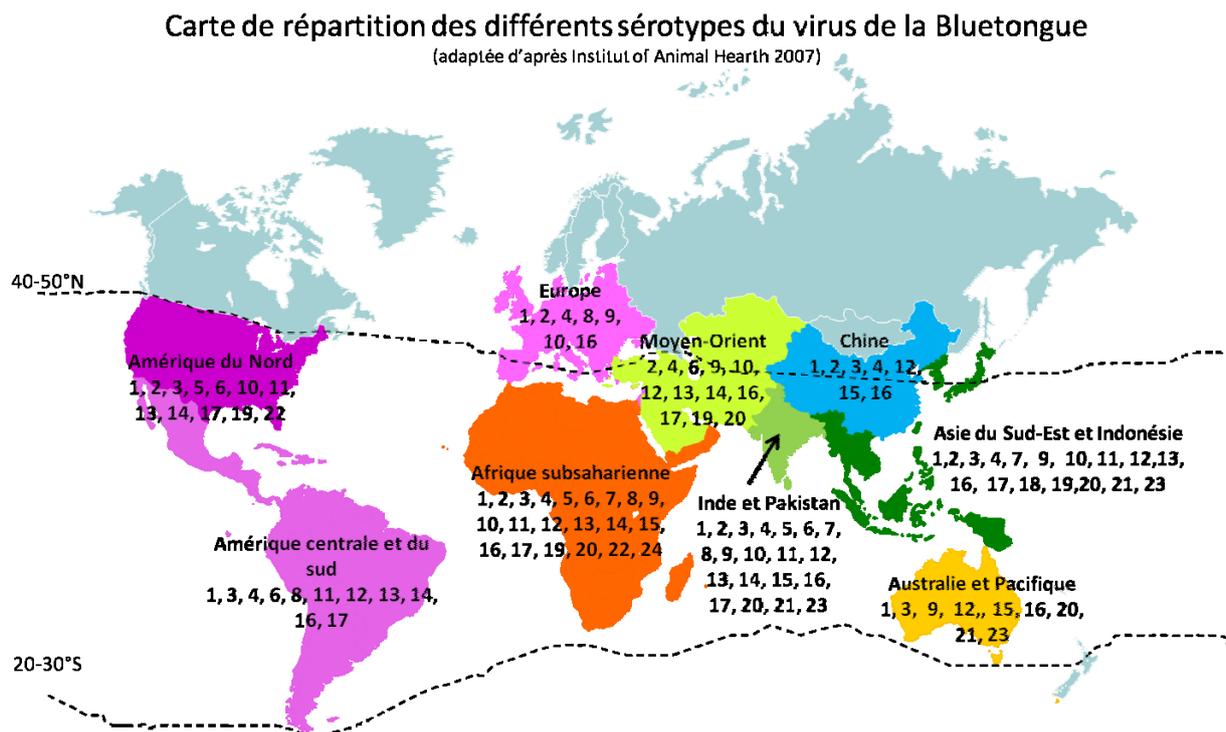
##### **1. Historique**

Selon Parsonson (1996), la FCO serait originaire du continent africain. Elle a été reconnue pour la première fois lors de l'introduction de moutons Mérinos et européens dans des élevages de la colonie du Cap en Afrique du Sud au XIXème siècle (150). Les références font état d'un syndrome fébrile avec une forte létalité et une morbidité d'environ 30%. Le tableau clinique de la maladie fut réellement décrit en 1902 par Hutcheon dans son rapport annuel. La maladie fut alors nommée " Malarial Catarrhal Fever " (151). Il a ensuite été montré que cette maladie était inoculable aux moutons et qu'elle se traduisait par un syndrome fébrile suivi par l'apparition d'érythème cutané, d'une teinte bleutée anormale de la langue, de sécrétions catarrhales nombreuses et d'une infiltration œdémateuse de toute la muqueuse gingivale. Le terme "malarial" fut par la suite remplacé par le nom commun de "Bluetongue" mot inventé par les éleveurs Boers pour décrire la cyanose de la langue, observée dans les cas sévères de la maladie chez certains moutons (309). A cette époque, on pensait que la matière virulente se trouvait dans le sérum et que la contamination se faisait par inoculation et non par contact. En 1906, les origines virales de la maladie ainsi que les animaux qui y sont sensibles ont été décrits par Theiler (327). A partir de 1940, la FCO fut clairement identifiée dans le bassin

méditerranéen, bien qu'elle ait été décrite à Chypre dès 1924. Le virus fut ainsi isolé à partir de sang de moutons malades sur l'île de Chypre en 1943 lors d'une épizootie particulièrement sévère (120). Parallèlement, il a été possible de mettre en évidence la transmission vectorielle de la FCO par infection des moutons par piqûres de *Culicoides imicola* (à l'époque connu sous le nom de *C. palidinennis*) gorgés 10 jours auparavant de sang de moutons virémiques (84). Dès 1946, des essais furent réalisés pour essayer d'obtenir des vaccins à partir de souches atténuées, mais les procédés d'atténuation n'étaient pas encore maîtrisés et les résultats restaient très variables. Cela permit par contre de démontrer l'existence de différentes souches de virus de la FCO, par l'étude de la protection croisée sur des moutons (248). Sur le continent américain, c'est au Texas en 1948 que la FCO apparut pour la première fois. La maladie y fut nommée " soremuzzle of sheep", le museau enflammé du mouton (136). Dans les années 1960, plusieurs souches virales furent isolées par culture sur œufs embryonnés de poulet (241) aux Etats-Unis mais aussi en Turquie, en Israël et en Syrie. L'apparition accrue de la FCO dans des régions très éloignées du monde dans le milieu du XXème siècle a été interprétée comme provenant du continent africain et très probablement des souches sud-africaines. Il est désormais évident que l'infection par le BTV se rencontre dans les régions tropicales, subtropicales et dans certaines régions tempérées du monde. Le BTV a ainsi été isolé chez les ruminants et/ou les insectes vecteurs de tous les continents sauf l'Antarctique (**Figure 10**).

## 2. Distribution de la FCO (Figure.10)

Jusque dans les années 2000, la distribution de la FCO était limitée par la présence de son vecteur biologique, dans une zone comprise au nord entre le 40<sup>ème</sup> et le 50<sup>ème</sup> parallèle et au sud entre le 20<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> parallèle avec une répartition hétérogène des sérotypes (**Figure 10**). Cette répartition s'explique par la présence des différents genres de *Culicoides*, capables de transmettre la maladie.

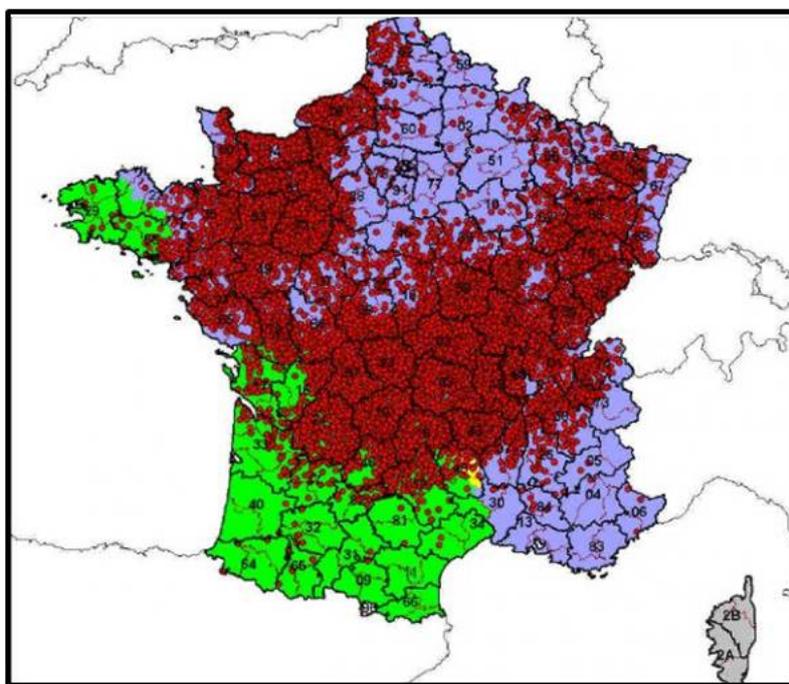


**Figure 10.** Répartition de la FCO dans le monde.

Dans les années 1990, des incursions, de type épizootique, ont été notifiées sur le pourtour méditerranéen, en raison probablement d'une extension de la zone de répartition de son vecteur biologique (220, 221, 340). En août 2006, l'introduction du sérotype 8 du BTV (BTV-8) en Europe occidentale et son extension rapide tout d'abord aux Pays-Bas, à la Belgique, l'Allemagne puis la France, a constitué un évènement sanitaire majeur en santé animale (10, 90, 91, 94, 328, 332). De 2006 à 2008, le BTV-8 a en effet infecté 13 pays de l'Union Européenne (UE) et la Suisse. Des 30 foyers déclarés en France en 2006, la situation s'est vite dégradée avec plus de 12500 foyers en 2007 et plus de 20000 foyers en 2008 (**Figure 11**).

L'apparition de la FCO aux Pays-Bas et son extension à l'Europe, a surpris l'ensemble des épidémiologistes. Ce pays n'était pas considéré à risque car aucune des sous-espèces de *Culicoides*, vectrices du BTV n'y avait été identifiée. Le mode d'introduction du BTV-8 n'est pas connu, il aurait pu se faire via le transport aérien de fleurs en provenance d'Afrique et l'introduction d'un vecteur contaminé. En 2007, le sérotype 1 du BTV (BTV-1), qui était déjà identifié en Espagne et au Portugal, a fait son apparition dans le sud Ouest de la France et l'infection s'est étendue dans tout le quart Sud-Ouest du pays. L'extension rapide du BTV-8 puis du BTV-1 a entraîné la restriction des mouvements des animaux et des pertes économiques considérables engendrant ainsi une grave crise sanitaire dans notre pays.

En 2008, deux sérotypes ont été identifiés, le BTV-6 aux Pays-Bas et le BTV-11 en Belgique. Toutefois ils n'ont pas entraîné d'épizootie, les souches virales isolées étant probablement atténuées. D'après les analyses de séquences nucléotidiques du segment variable 2 des sérotypes 6 et 11, il semble en effet que ces deux virus soient des souches vaccinales utilisées dans les vaccins atténués produits en Afrique du Sud (73, 201).



**Figure 11.** Situation de la France en 2008. En rond rouge : foyer de FCO BTV-8 dû à la circulation virale 2008, en rond bleu : foyer de FCO BTV-1, Zone en bleu: zone réglementée BTV-8, Zone verte: zone réglementée BTV-1 et BTV-8, zone en jaune : extension de la réglementée BTV-1 et BTV-8, zone en gris : zone réglementée BTV-1, -2, -16.

Au final, l'extension de la répartition de la FCO dans le monde ces dernières années serait due à plusieurs facteurs tels que la mondialisation du commerce et des transports, l'extension de la distribution du vecteur biologique en raison notamment des changements climatiques, l'adaptation possible du BTV à de nouveaux vecteurs non identifiés mais pérennes en Europe, et la présence possible d'un réservoir permettant au virus de persister pendant l'hiver en l'absence de vecteurs adultes (242, 354).

### **3. La maladie**

Le BTV infecte naturellement les ruminants domestiques et sauvages et les camélidés de l'ancien et du nouveau monde (10, 60, 62, 71, 96, 139, 228). L'infection a aussi été décrite exceptionnellement chez des chiens vaccinés avec un vaccin contaminé par le BTV-11. La maladie a été reproduite expérimentalement chez des chiens après avoir vacciné des animaux gestants avec ce même vaccin (5, 38, 99). La mortalité observée chez ces animaux était consécutive à la présence d'un œdème pulmonaire d'intensité sévère. Des œdèmes pulmonaires ont également été décrits chez un lynx d'Eurasie en captivité, qui se serait contaminé en consommant de la viande de ruminant contaminée (160).

Le BTV est principalement responsable de signes cliniques sévères chez certaines races ovines et certaines espèces de cervidés. Les symptômes provoqués chez les bovins, les caprins et les ruminants sauvages sont en général d'intensité moins importante voire inexistantes, sauf avec certains sérotypes ou certaines souches virales. Pour ces espèces, seule la présence d'anticorps, traduisant une séroconversion due au virus de la FCO, est donc le plus souvent mise en évidence. La sévérité des signes cliniques dépend également de la réceptivité de l'hôte liée notamment au statut immunitaire, à l'âge et à la race des animaux infectés (121, 342) mais aussi de l'influence de facteurs environnementaux (231). La période d'incubation

varie entre cinq et vingt jours dans les conditions naturelles et entre six et huit jours dans les conditions expérimentales (175).

### 3.1. Chez les ovins

La sévérité de la maladie se rencontre plus fréquemment chez les races ovines dites améliorées. Chez les races rustiques d'Afrique ou d'Amérique du Sud, seule la présence d'anticorps témoigne la plupart du temps de l'infection de ces animaux. Tout au plus on note une hyperthermie transitoire.

Dans la forme aiguë classique, les animaux présentent un syndrome fébrile aigu avec une hyperthermie pouvant atteindre 42°C persistant 4 à 8 jours, de l'abattement et une anorexie. Des phénomènes congestifs, œdémateux et hémorragiques apparaissent rapidement dans les 24 à 48 heures, tout d'abord, sur les muqueuses buccale, nasale et oculaire, engendrant du ptyalisme, un jetage séreux abondant et un épiphora. Un œdème de la langue et des lèvres est couramment observé, qui peut parfois s'étendre à l'ensemble de la tête voire au fanon (192). La cyanose de langue qui a donné son nom en anglais à la maladie (bluetongue) n'est pas toujours présente. Des ulcérations superficielles apparaissent au bout de deux à trois jours sur les gencives, les lèvres, le museau puis dans l'ensemble de la cavité buccale. La salive contient du sang et a une odeur nauséabonde, le jetage devient purulent et obstrue les cavités nasales (192).

A partir du sixième jour, l'animal peut présenter une boiterie, une difficulté pour se déplacer ou avoir des postures anormales (raideur, toricolis, dos voussé), signes d'une myosite dégénérative (192). Une congestion du bourrelet coronaire est fréquemment observée et reste quelquefois visible même après guérison. La congestion cutanée peut se généraliser et entraîner une chute de la laine en quelques semaines. La fonte musculaire est quelquefois impressionnante puisque l'animal peut perdre 30 à 40 % de son poids en quelques jours. La mort survient en général au bout d'une semaine, en raison d'un œdème pulmonaire ou un peu

plus tard suite à des complications bactériennes (36, 192). Des mortalités suraigües (2-3 jours) ont été décrites chez les animaux les plus sensibles (362). La guérison est également possible mais après une longue période de convalescence. Les animaux qui survivent n'ont plus de valeur économique.

Enfin, le tropisme du BTV-8 pour le fœtus, observé lors de l'épizootie de 2008 en Europe, serait à l'origine d'avortements et de malformations congénitales (361).

### **3.2. Chez les caprins et les bovins**

L'infection chez les caprins et les bovins est en général asymptomatique mais le virus peut être responsable sur une petite partie des animaux (moins de 1%) d'états de faiblesse, d'hyperthermie transitoire ou de signes cliniques respiratoires ou cutanés qui peuvent être difficiles à rattacher à une étiologie certaine (192).

Le sérotype 8 du BTV isolé en Europe est particulier, de par la fréquence du nombre de bovins malades et de par l'intensité des signes cliniques observés. Le BTV-8 a été, en effet, responsable chez les bovins, de formes cliniques se traduisant par un syndrome fébrile sévère, un abattement, des boiteries et dans certains cas, des signes cliniques similaires à ceux observés dans la forme aigüe des ovins (6, 35). Par ailleurs, des troubles de la reproduction (avortements, malformations, mortinatalités) ont été observés chez les bovins. De même la maladie a pu être observée dans un nombre limité d'élevages caprins, les animaux ayant développé un syndrome fébrile ainsi qu'une chute importante de la production laitière. Certains animaux présentaient un œdème des lèvres et de la tête, du jetage et des croûtes sur le mufle et les lèvres, de l'érythème et des hémorragies sous cutanées au niveau de la mamelle (91, 92).

### 3.3. Chez les autres herbivores

Parmi les animaux domestiques, les camélidés du Nouveau-Monde étaient considérés comme réceptifs à l'infection par le BTV, sans qu'ils ne présentent de signes cliniques. Toutefois, il a été récemment décrit en Europe des formes cliniques cardio-respiratoires mortelles chez les lamas (139, 228).

Dans la faune sauvage africaine, de nombreuses espèces de mammifères, notamment les buffles, les grands koudous, impalas et springboks, apparaissent séropositifs au BTV, sans présenter des signes cliniques. De même, en Amérique du nord, des cerfs muets et les wapitis ont été trouvés séropositifs (168, 206). En Europe, les cervidés sont principalement infectés par le BTV. Toutefois, ils sont rarement cliniquement atteints et leur rôle épidémiologique dans l'infection des ruminants domestiques est encore mal connu. On considère actuellement que l'infection des cervidés est plutôt la conséquence d'une épizootie chez les ruminants domestiques.

## B. Le virus de la bluetongue (BTV)

### 1. Classification

L'agent étiologique responsable de la FCO est le BTV. Il s'agit d'un virus à ARN double brin segmenté appartenant à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus* (31), transmis essentiellement par des moucheron du genre *Culicoides*. Parmi les *orbivirus*, le BTV et les virus de la maladie hémorragique épizootique du cerf (epizootic haemorrhagic disease of deer virus, EHDV) et de la peste équine (African Horsesickness virus, AHSV) constituent des risques sanitaires majeurs.

Les orbivirus sont divisés en sérogroupe, les virus d'un même sérogroupe possèdent un antigène commun (protéine VP7) localisé au niveau de la capsid interne, qui confère une

réactivité sérologique croisée. Actuellement, 14 sérogroupes distincts sont identifiés ainsi qu'un ensemble de virus non groupés. Chaque séro groupe est divisé en sérotypes (128). Les antigènes qui définissent les sérotypes sont associés à la capsid externe (protéine VP2 principalement) et induisent la production d'anticorps neutralisants (167). Le BTV comprend classiquement 24 sérotypes, un 25<sup>ème</sup> sérotype ayant récemment été identifié chez la chèvre, le *Toggenvurg virus* (TOV) (51, 144). La définition du sérotype repose sur l'absence de réaction sérologique contre VP2 entre les différents isolats de chaque sérotype. Des relations antigéniques croisées peuvent cependant subsister entre certains sérotypes (**Figure 12**), notamment entre les sérotypes 4, 20 et 17, entre les sérotypes 5 et 9, entre les sérotypes 8 et 18, entre les sérotypes 6 et 21 et entre les sérotypes 3 et 16. Le sérotype 4 serait considéré comme le sérotype ancestral (199).

## 2. Structure

Le BTV est un virus de petite taille (60 à 80nm), dépourvu d'enveloppe virale et qui possède une capsid à symétrie icosaédrique (130, 148, 246). Cette capsid résulte d'un assemblage de 32 capsomères qui ont une forme en anneau lorsqu'ils sont observés en microscopie électronique (127). Cela a valu son nom au genre, *orbis* signifiant anneau en latin.

La capsid est composée d'une capsid externe et d'une capsid interne dans laquelle loge le génome viral. La capsid externe est composée de deux protéines structurales, 60 trimères de VP2 (111kDa) et 120 trimères de VP5 (59kDa). La capsid interne quant à elle, est constituée de deux couches protéiques, la nucléocapsid (core) et la matrice (subcore) (**Figure 13**). La nucléocapsid est composée essentiellement de la protéine structurale VP7 (38kDa), organisée en 132 capsomères (246, 274). La matrice ou subcore est composée de 12 décimères de la protéine VP3 (100kDa). Elle interagit avec les 3 protéines structurales mineures VP1, VP4 et VP7 impliquées dans la transcription et la réplication du BTV.

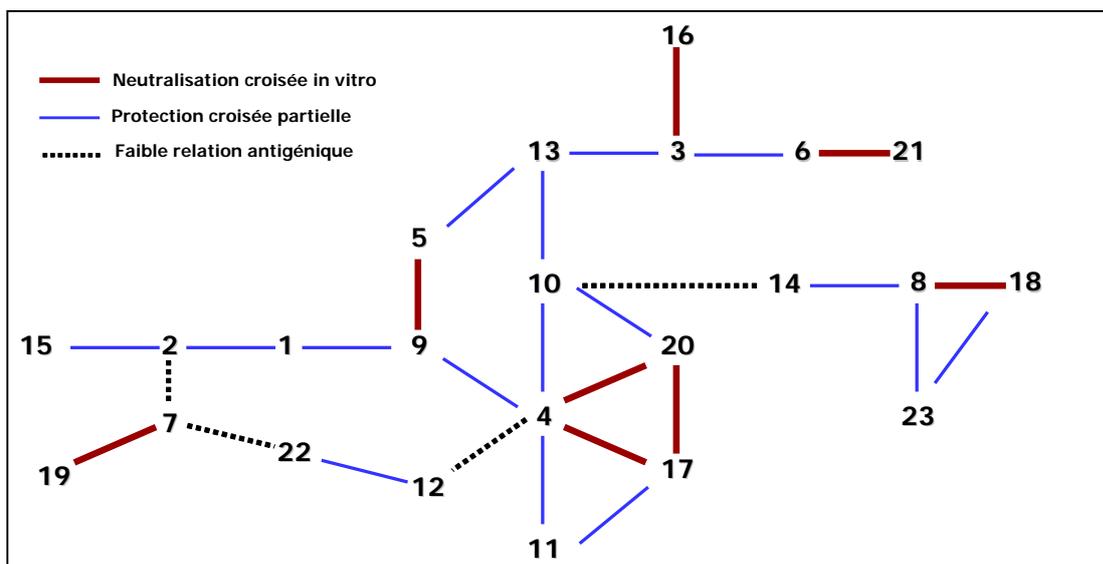


Figure 12. Représentation schématique des relations antigéniques entre sérotypes du BTV

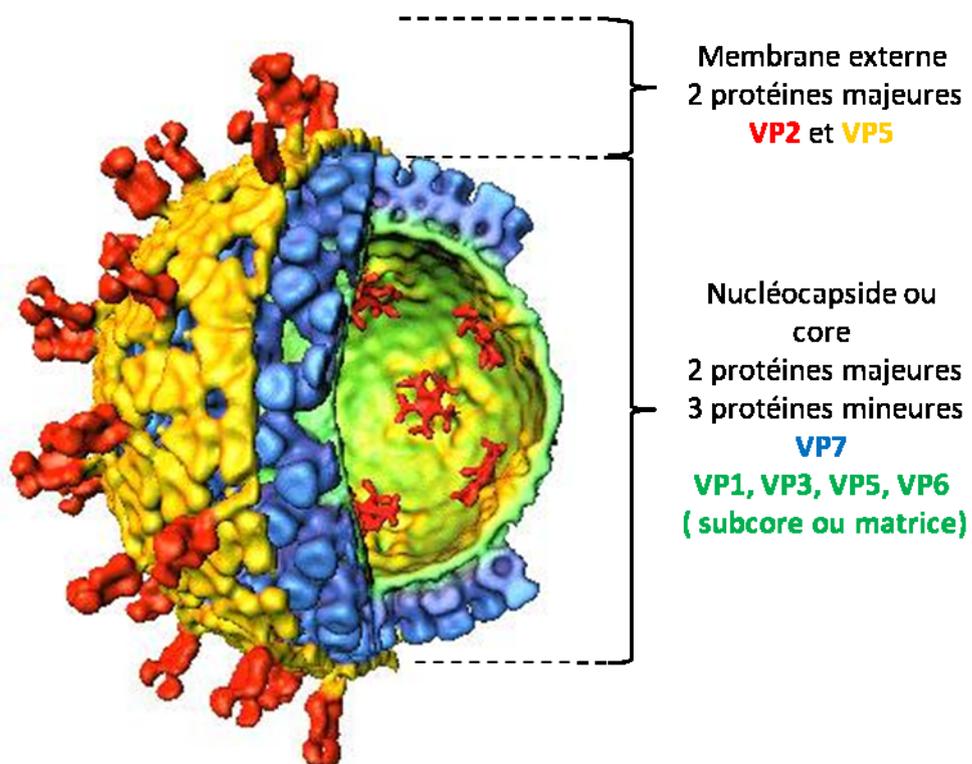


Figure 13. Structure et morphologie du virus de la FCO

### 3. Organisation génomique et protéines virales

Il s'agit d'un virus à ARN double brin, linéaire et contenant 10 segments de taille variable. Le génome viral comprend environ 19300 paires de base, répartis sur les 10 segments linéaires d'ARNdb, divisés en segments longs (L), moyens (M) et courts (S) selon leur taille sur gel de polyacrylamide. Sa masse molaire varie de 12 à 20.10<sup>6</sup>daltons (Da). Chaque segment d'ARNdb du virus BTV code pour une protéine, excepté le segment S10 qui code pour 2 protéines, NS3 et NS3a. Les produits d'expression des différents gènes, leur taille ainsi que leur localisation sont résumés dans le **tableau 6**. Parmi les protéines produites nous pouvons les classer en 2 parties, les protéines structurales VP1 à VP7 et les protéines non structurales NS1 à NS3 (**Tableau 6**).

### 4. Cycle de réplication (Figure 14)

Chez les mammifères, la réplication du virus s'effectue dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales. Dans un premier temps, le virus s'attache à son récepteur localisé sur la membrane cellulaire. Le récepteur cellulaire, quant à lui, n'est pas encore identifié. Pour les erythrocytes, le virus se fixerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 à des glycoprotéines (les glycophorines) présentes à la surface des hématies d'origine humaine et animale (87). Les particules du BTV peuvent également se fixer aux cellules d'insectes via des trimères de VP7 (223, 323, 356). L'interaction de la protéine VP2 avec son ligand cellulaire déclenche l'internalisation du virus dans les endosomes via une voie d'endocytose clathrine-dépendante (110). Par la suite, l'acidification des endosomes et la fusion de VP5 avec la membrane endosomale entraînent la libération de la capsid interne dans le cytoplasme de la cellule.

L'initiation de la transcription est effectuée dans les virions dépourvus de la capsid externe mais aucune étude n'a permis de préciser si cela se passait dans les vésicules lysosomales ou après la libération de la capsid interne (128). Comme d'autres membres de la famille des *Reoviridae*, le BTV se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Segments (taille en pb)	Protéines	Masse molaire (Da) <sup>1,2</sup>	Localisation <sup>4,5,6,7</sup>	Nombre de molécules par virion <sup>3,4</sup>	Propriétés
1 (3954)	VP1	149 588	Protéine mineure de la capsid interne	11	Antigène de groupe ARN polymérase ARN dépendante <sup>8,9</sup>
2 (2926)	VP2	111 112	Protéine majeure de la capsid externe	180	Spécificité de type <sup>4,7,10,11,12</sup> Antigène protecteur <sup>13</sup> Ligand récepteur cellulaire <sup>7,13</sup> Protéine la plus variable <sup>7,12</sup>
3 (2770)	VP3	103 344	Protéine majeure de la capsid interne	120	Antigène de groupe Contrôle la taille et l'organisation de la structure de la capsid <sup>14,15</sup> Interagit avec les protéines mineures du subcore <sup>14,15</sup>
4 (1981)	VP4	76 433	Protéine mineure de la capsid interne	20	Guanylyltransférase <sup>16</sup>
5 (1769)	NS1	64 445	Protéine non structurale	0	Forme des tubules dans le cytoplasme des cellules <sup>17,18</sup>
6 (1638)	VP5	59 163	Protéine majeure de la capsid externe	360	Spécificité de groupe <sup>7,10,11</sup>
7 (1156)	VP7	38 548	Protéine majeure de la capsid interne	780	Intervient dans l'entrée dans la cellule <sup>19,20</sup> Antigène de groupe <sup>3,12,21</sup>
8 (1124)	NS2	40 999	Protéine non structurale	0	Associée aux corps d'inclusion <sup>22,23</sup> Fixe les ARN messagers <sup>24</sup>
9 (1046)	VP6	35 750	Protéine mineure de la capsid interne	72	Antigène de groupe Fixe les ARN sb et db <sup>25</sup> Hélicase <sup>26</sup>
10 (822)	NS3/NS3A	25572 / 24020	Protéines non structurales	0	Glycoprotéine <sup>27,28</sup> Libération des virions <sup>29,30</sup>

**Tableau 6.** Caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO. Adapté de <sup>1</sup>Roy, 1992a, <sup>2</sup>Roy, 1989 ; <sup>3</sup>Huisman & Vandisjk, 1990 ; <sup>4</sup>Pedley et al., 1988 ; <sup>5</sup>Hewat et al., 1992a ; <sup>6</sup>Mertens et al., 1984 ; <sup>7</sup>Mertens et al., 1987a ; <sup>8</sup>Roy et al., 1988 ; <sup>9</sup>Urakawa et al., 1989 ; <sup>10</sup>Cowley & Gorman, 1989 ; <sup>11</sup>Mertens et al., 1989 ; <sup>12</sup>Roy et al., 1989 ; <sup>13</sup>Huisman et al., 1987a ; <sup>14</sup>Gouet et al., 1999 ; <sup>15</sup>Grimes et al., 1998 ; <sup>16</sup>Le Blois et al., 1992 ; <sup>17</sup>Hewat et al., 1992b ; <sup>18</sup>Huisman & Els, 1979 ; <sup>19</sup>Mertens et al., 1996 ; <sup>20</sup>Xu et al., 1997 ; <sup>21</sup>Gumm & Newman, 1982 ; <sup>22</sup>Brookes et al., 1993 ; <sup>23</sup>Thomas et al., 1990 ; <sup>24</sup>Kar et al., 2007 ; <sup>25</sup>Theron et al., 1994 ; <sup>26</sup>Roy et al., 1990a ; <sup>27</sup>Stauber et al., 1997 ; <sup>28</sup>Wu et al., 1992 ; <sup>29</sup>Bansal et al., 1998 ; <sup>30</sup>Hyatt et al., 1993.

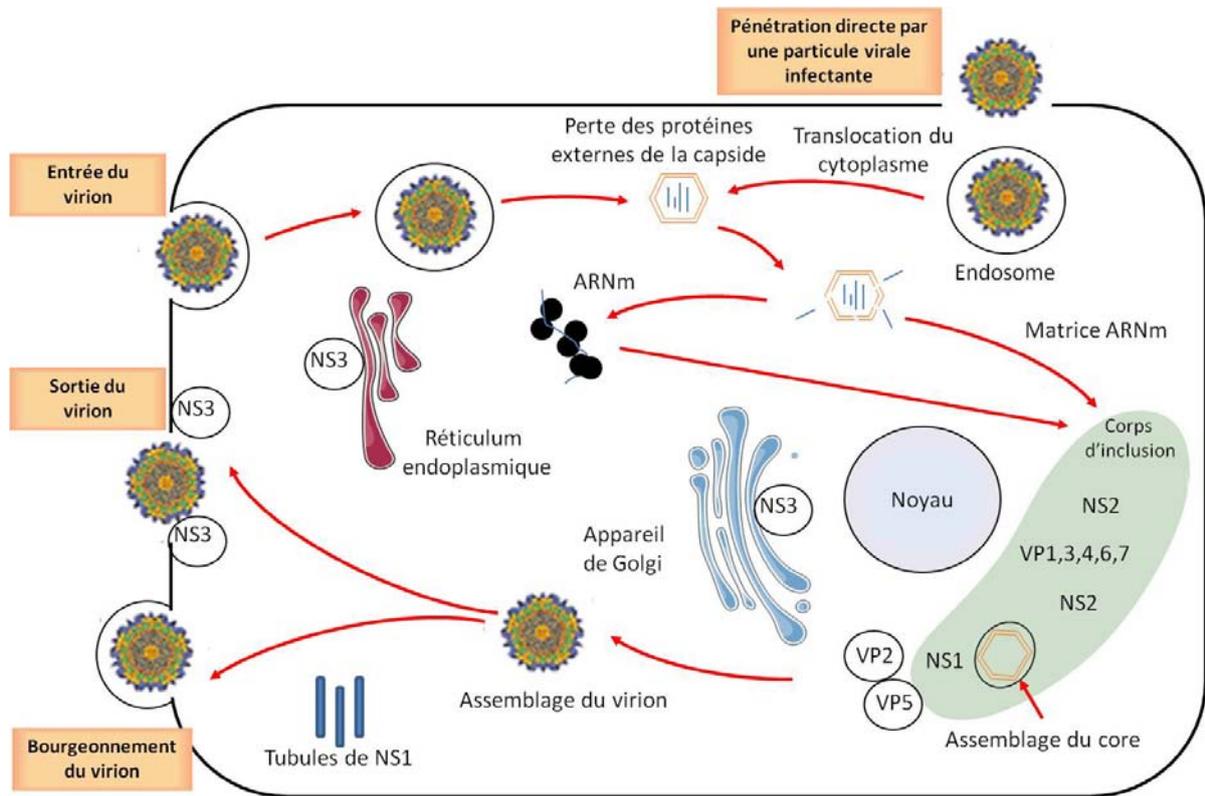


Figure 14. Cycle de réplication du BTM (adapté de Roy, 1996 (276)).

Dans la capsidie interne, l'ARN polymérase ARN-dépendante (VP1) transcrit les brins sens négatifs de chacun des dix segments ARNdb du génome du BTV en ARN messagers précoces (34). Par les activités guanylyl-transférase et transméthylase de la VP4 (319), ces ARNm précoces sont coiffés et méthylés. Ils peuvent ensuite quitter la capsidie interne par des pores situés aux 12 sommets de la particule virale (224). Ces pores apparaissent suite à une modification de la conformation de VP7 et VP3 lors de la libération de la capsidie interne dans le cytoplasme. Les ARNm viraux vont servir de matrice pour la traduction des protéines virales, qui débute deux heures après l'infection (82). La protéine VP4 va favoriser la traduction d'ARN viraux tardifs non coiffés, aboutissant à la synthèse des protéines virales structurales et va aussi inactiver la traduction des ARNm coiffés codant pour les protéines cellulaires par un mécanisme encore inconnu. La réplication virale a principalement lieu dans des corps d'inclusions viraux (VIB). La protéine NS2 est le constituant majeur des VIB, localisés près de la membrane nucléaire dans les cellules infectées. Les ARN génomiques négatifs sont majoritairement synthétisés à partir des ARN positifs préalablement transcrits. Cette synthèse s'effectue simultanément à la formation des particules pro virales. La protéine NS2, une phosphoprotéine, se fixe sur les ARNsb et interviendrait dans la réplication (176). Les brins complémentaires ainsi synthétisés restent associés aux brins parentaux sous forme d'ARNsb. Les mécanismes par lesquels les dix ARNdb génomiques s'associent ensemble à l'intérieur de chaque particule virale en formation restent inconnus. La protéine VP6 pourrait jouer un rôle dans l'encapsidation des ARNdb. Un modèle d'assemblage a été proposé (194) dans lequel les protéines VP3 synthétisées forment d'abord une particule instable à géométrie icosaédrique. Les trois protéines VP1, VP4 et VP6 interagissent rapidement avec cette structure dans laquelle les ARNsb positifs sont encapsidés puis répliqués. La protéine VP7, sous forme de trimère, se fixe alors à la surface de cette capsidie interne. Les protéines VP2 et VP5 se fixeraient lors du trajet à la membrane plasmique pour former la capsidie externe.

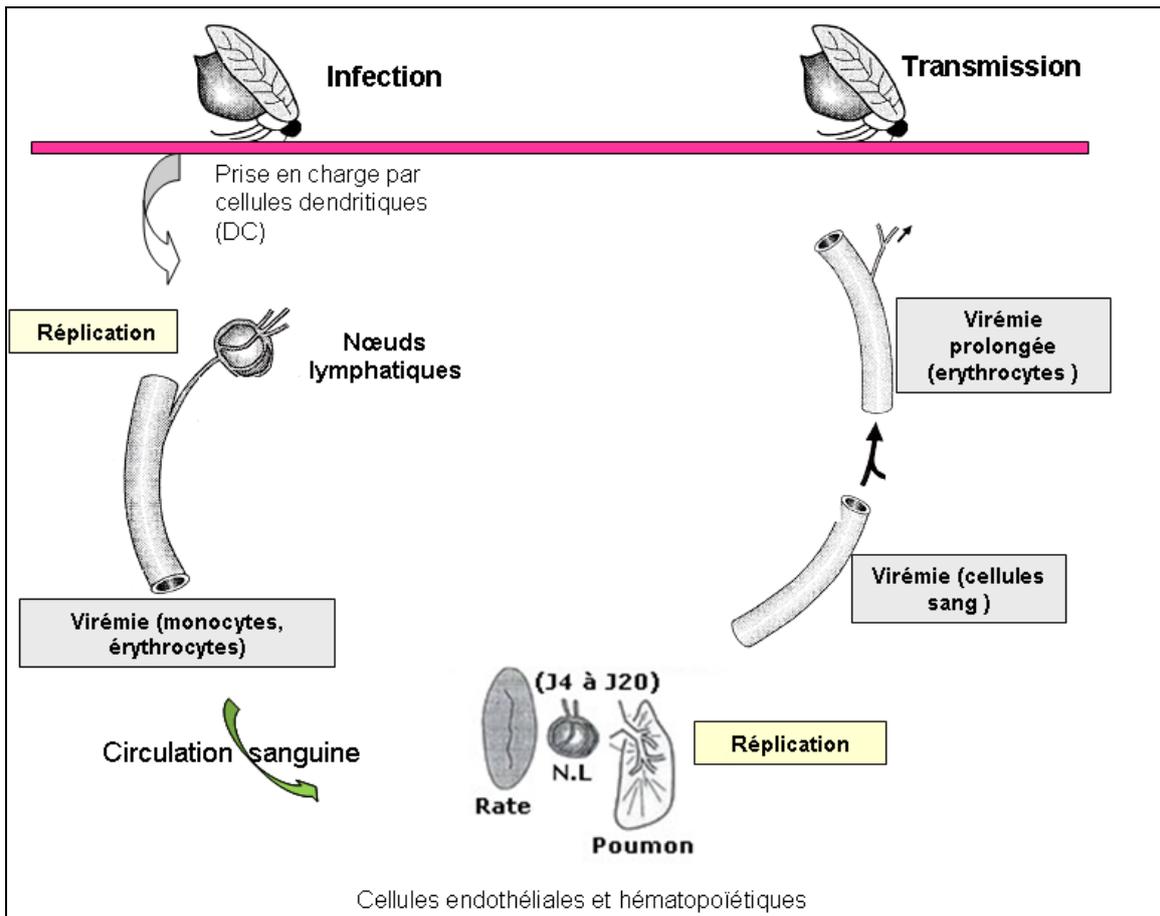
Les virions sont ensuite transportés dans le cytoplasme par des microtubules impliquant des interactions entre VP2 et la vimentine (27) vers le système membranaire de la cellule (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). La libération des virions des cellules infectées se fait soit lors de la lyse cellulaire, soit par déstabilisation des membranes cellulaires grâce à l'activité viroporine de la protéine NS3 (135). Dans ce cas on observe la sortie des virions par bourgeonnement sans destruction cellulaire (17, 152). La production de particules matures est exponentielle durant 8 à 24 heures après infection.

Les échanges de segments d'ARNdb peuvent se produire lorsque deux virus différents de la FCO (sérotypes ou souches) infectent les mêmes cellules, contribuant ainsi à l'évolution du virus de la FCO dans le processus de réassortiment. Le processus de réassortiment peut entraîner la fusion des corps d'inclusion formés à partir de différentes particules virales. Pour des raisons inconnues, certains segments sont plus souvent échangés que d'autres (128).

## **C. Physiopathologie de la FCO**

### **1. Pathogénie du BTV (Figure 15)**

Après avoir été ingéré par l'insecte lors du repas sanguin, le virus traverse la barrière intestinale et se multiplie dans l'hémocoèle. Il diffuse ensuite dans l'organisme et atteint les glandes salivaires où un cycle de multiplication se déroule. Suite à une piqûre, il est ensuite transmis à un hôte vertébré. Le virus migre de la peau vers les nœuds lymphatiques drainant le site d'infection, grâce aux cellules dendritiques circulantes (DC<sub>C</sub>) (138). Les DC<sub>C</sub> s'infecteraient au niveau du derme, transporteraient le BTV jusqu'au nœud lymphatique où elles présenteraient le virus au système immunitaire spécifique, activant la prolifération des lymphocytes CD4 et CD8 ainsi que la production d'IFN $\gamma$  (138). Un premier cycle de réplication a lieu dans les nœuds lymphatiques puis le BTV diffuse ensuite par voie lymphatique et sanguine, probablement associé aux monocytes et aux érythrocytes (12).



**Figure 15:** Schéma synthétique de la pathogénie du BTV, adapté de Barrat-Boyes (12)

Un deuxième cycle de réplication a lieu dans les sites secondaires, principalement les poumons, la rate, les amygdales et les nœuds lymphatiques (10, 12, 13, 72, 93, 205, 208). A cette étape, la charge virale dans le sang est élevée, notamment dans les cellules mononucléées sanguines, ce qui permet la détection du virus, l'infection d'autres vecteurs hématophages et la dissémination du virus dans de nombreux tissus. Dans les sites secondaires, le virus se multiplie dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales et provoque la dégénérescence et la nécrose de l'endothélium vasculaire. C'est l'atteinte des cellules endothéliales qui entraînerait un réarrangement du cytosquelette MAP kinase p38 dépendant (56), et par conséquent provoquerait une fragilité capillaire à l'origine des hémorragies et œdèmes observés chez les animaux malades (192). Toutefois les données divergent sur l'étendue des endothéliums atteints et la sévérité des lésions observées, selon les modèles expérimentaux utilisés et les sérotypes viraux. Ainsi, MacLachlan et al. (2008) observent après infection expérimentale, des signes sévères d'œdème respiratoire sans lésions majeures des endothéliums (204). Il semblerait que l'atteinte des endothéliums résulte à la fois d'un effet direct cytopathique du BTV mais aussi d'une réaction des cellules endothéliales à des chimiokines produites lors de l'infection. Par ailleurs, il a été suggéré que la différence de sensibilité des ovins et des bovins pourrait s'expliquer en partie par l'atteinte différentielle des cellules endothéliales entre ces deux espèces (76-78)

A partir d'une vingtaine de jours, le virus est retrouvé dans le sang majoritairement associé aux érythrocytes. Cette virémie peut persister plusieurs semaines, même en présence d'anticorps neutralisants. Plusieurs facteurs peuvent influencer la durée de la virémie, tels que le sérotype impliqué ou l'espèce animale considérée. Chez les bovins, les particules infectieuses BTV peuvent être détectées dans le sang jusqu'à 35 à 60 jours (12) et l'ARN viral jusqu'à 222 jours (29).

La présence d'ARN viral ne reflète toutefois pas la viabilité du virus et sa capacité à infecter le vecteur (6, 90). La virémie prolongée pourrait expliquer la persistance du virus pendant l'hiver, en l'absence de vecteurs biologiques, et donc la pérennisation de l'infection (37).

## **2. La réponse de l'hôte**

Suite à une infection par le BTV, l'hôte va mettre en place une réponse innée et une réponse immune adaptative pouvant être protectrice contre la maladie (156, 162, 166). En général, la réponse immunitaire induite par le BTV est protectrice et durable mais seulement contre le sérotype homologue. Il est communément admis qu'il n'y a pas de protection croisée entre les sérotypes bien qu'une protection partielle soit suspectée entre certains sérotypes.

### **2.1. Réponse inflammatoire**

De nombreuses données *in vivo*, chez les ovins (112), les bovins (207) et la souris (157) montrent que le BTV est un inducteur puissant d'IFN de type I (IFN-I). Chez la souris, le sérotype 8 du BTV semble être un inducteur d'interféron très puissant, même lorsque la souche virale utilisée est irradiée par les UV (158). *In vitro*, une grande variété de cellules, tels que les cellules d'embryon de souris (147) des leucocytes humains (157) ou de moutons (268) produisent des IFN-I après stimulation par le BTV. Toutefois, la capacité à induire l'IFN-I peut différer selon le contexte cellulaire et la souche virale utilisée (119). L'ARN double brin du BTV induit également de l'IFN-I chez la souris (88).

## 2.2. Réponse humorale

Des études de transfert passif de sérum ont montré que les anticorps spécifiques du BTV induisent une protection sérotype-dépendante, suggérant un rôle *in vivo* des anticorps neutralisants (167). Cependant, les mécanismes des interactions entre les anticorps neutralisants et le BTV *in vivo* ne sont pas encore connus. Les tentatives visant à démontrer l'existence de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et facilitée par le complément chez les bovins et les ovins, ont constamment échoué (161). VP2 et, dans une moindre mesure VP5, sont les seules protéines du BTV capable d'induire des anticorps neutralisants (197, 277), VP2 étant la principale protéine impliquée dans la spécificité du sérotype (148, 225). Des moutons inoculés avec la protéine VP2, isolée à partir de particules intactes ou générée *in vitro*, produisent des anticorps neutralisants et sont protégés contre des inoculations d'épreuve homologues par le BTV (149, 274). Deux domaines hydrophiles dans la protéine VP2, les domaines amino-acides (AA) 199-213 (région 1) et AA321-346 (région 2), contiendraient plusieurs épitopes conformationnels de neutralisation (75). Des mutations dans la région 1 de la protéine VP2 d'une souche de BTV-17 modifient les propriétés antigéniques de cette souche en lui conférant des caractéristiques distinctes de seroneutralisation (353).

La co-expression de VP5 avec VP2, en système baculovirus ou en système VACV, permettrait, après inoculation à des moutons, d'induire des titres plus élevés en anticorps neutralisants le BTV, par rapport à VP2 seule (197, 274, 277, 281). VP5 semble ainsi améliorer la neutralisation du BTV, probablement en modifiant la conformation de VP2, (63, 225). En outre il a été montré que VP5, produite en système VACV, pouvait induire directement des anticorps neutralisants (197) bien que ces données n'aient jamais été confirmées par d'autres équipes et que les anticorps neutralisants dirigés contre la VP5 n'aient jamais été décrits. A l'heure actuelle, il est considéré que la réponse en anticorps neutralisants

joue un rôle majeur dans la protection contre une infection ou une ré-infection par le BTV. Toutefois les anticorps neutralisants sont sérotype-spécifiques et protègent seulement contre une épreuve homologe de BTV. Il pourrait exister un niveau de protection croisée entre certains sérotypes via les anticorps neutralisants dirigés contre des VP2 présentant des séquences amino-acides apparentées (200).

### **2.3. Réponse cellulaire**

Les protéines structurales VP7, VP2 et VP5 ainsi que les protéines non structurales NS1 et NS2 seraient impliquées dans l'induction de la réponse immunitaire cellulaire (9, 161-166, 173, 321, 346).

La réponse lymphocytes T cytotoxique CD8<sup>+</sup> (CTL) serait médiée chez le mouton principalement par les protéines VP2 et NS1, VP3, VP5 et VP7 jouant un rôle mineur (9, 158, 162, 322). Seuls les CTL spécifiques de NS1 pourraient participer à une protection croisée entre les sérotypes du BTV (9, 162, 172). La protéine NS2 génèrerait des CTL chez la souris (164, 172). Des baculovirus exprimant les protéines NS1, NS2, NS3, VP1, VP4 et VP6 induisent en effet une réponse CTL chez des souris (173). Toutefois après inoculation d'épreuve avec des VACV exprimant les différentes protéines du BTV, une protection partielle n'a été obtenue que contre le VACV exprimant NS2. Ces CTL spécifiques de NS2 ont été uniquement observées chez la souris (173), mettant en évidence des variations importantes de la réponse cytotoxique entre les espèces hôtes.

Les déterminants de la réponse auxiliaire en lymphocytes CD4<sup>+</sup> (LTh), sont présents dans VP2, VP3 et VP7. Les LTh de VP2 sont spécifiques du sérotype et les LTh de VP3 et VP7 pourraient participer à une protection croisée partielle (322).

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

La lutte contre la FCO repose sur des mesures de prophylaxie sanitaire et médicale. La prévention sanitaire est assurée par la mise en place de zones dites réglementées lors de détection d'un foyer infectieux, par la quarantaine des exploitations touchées, le contrôle des échanges d'animaux dans les zones infectées et la lutte contre le vecteur biologique. Toutefois la vaccination reste le moyen le plus efficace et indispensable pour lutter contre l'extension de la maladie ou pour prévenir son apparition.

### **1. Vaccins commercialisés : avantages et inconvénients**

Deux types de vaccins sont actuellement commercialisés pour lutter contre la FCO, des vaccins vivants à base de souches atténuées et des vaccins inactivés. Comme pour une infection naturelle, la réponse immunitaire induite par la vaccination n'apporte qu'une protection contre le sérotype homologue, et ce, quel que soit le type de vaccin utilisé. Dans les régions où plusieurs sérotypes de BTV coexistent, l'utilisation de vaccins multivalents est donc nécessaire.

#### **1.1. Vaccins atténués**

Les vaccins à base de virus atténués, produits en Afrique du Sud par le Onderstepoort Biological Products, ont longtemps été utilisés pour contrôler la FCO dans le sud de l'Afrique, aux USA et plus récemment en Corse, aux Baléares et en Italie (291). Ils peuvent être utilisés chez les ovins, les bovins et les caprins. Ces vaccins sont peu coûteux à produire et induisent une réponse immunitaire forte et de longue durée (>1an) car ils miment la réponse immunitaire induite après une infection naturelle (291). En conditions expérimentales ils offrent une protection robuste après une injection unique. Il est aussi possible de mélanger plusieurs souches atténuées de sérotypes différents par vaccin pour une protection multi-

sérotypes. Ainsi les vaccins sud-africains peuvent être utilisés sous forme monovalente jusqu'à pentavalente.

Malgré leur efficacité, ces vaccins présentent certains inconvénients liés à leur utilisation :

- Leur innocuité n'est pas totale dans certaines races ovines améliorées (341). Etant donné que l'atténuation du virus est difficile à contrôler, ces vaccins peuvent en effet générer des effets secondaires (fièvre, œdèmes, boiteries) (293), ainsi qu'une baisse de la production de lait (231, 292) et de la qualité du sperme (291). Pour exemple un vaccin BTV-16 atténué a entraîné des signes cliniques chez les moutons lors de son utilisation en Corse en 2004-2005 et dans le reste de l'Europe (293). Enfin, des effets tératogènes sur le fœtus ont également été observés lors de la vaccination de femelles gestantes (207, 244). Il semblerait que les passages en culture cellulaire pour l'atténuation augmentent le tropisme du virus pour le fœtus.
- Ces souches atténuées se multiplient chez l'hôte, peuvent infester des *Culicoides* et ainsi être transmises à des ruminants non vaccinés (107, 232, 341). Par ailleurs une recombinaison entre les souches sauvages et les souches vaccinales est également possible, si les deux virus pénètrent dans une même cellule, pouvant générer un nouveau variant viral. En 2002, un BTV réassortant entre deux souches de BTV-2 et de BTV-16 a ainsi été identifié *chez un animal* en Italie (16).
- Une réversion de virulence est toujours envisageable, d'autant plus que les bases moléculaires de l'atténuation ne sont pas connues.
- Enfin, les vaccins multivalents (342) ne permettent pas de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés et ne sont donc pas compatibles avec une stratégie DIVA.

## 1.2. Les vaccins inactivés

Les vaccins à virus inactivé sont plus récents de conception. Ils ont notamment été conçus pour lutter contre les épizooties à BTV-1, BTV-2, BTV-4 et BTV-8 apparues en Europe. Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique (chaleur, UV) ou chimique (formol, bétapropioloactone, éthylèneimine) ce qui entraîne une perte totale d'infectivité sans dénaturer le pouvoir immunogène (47, 256, 313, 317, 318). Ce type de vaccins offre un certain nombre d'avantages par rapport aux vaccins à virus atténués, notamment l'impossibilité de répllication du virus, de transmission aux vecteurs donc de réassortiments entre les souches et de réversion de virulence.

Des essais sur le terrain et en conditions expérimentales ont prouvé l'efficacité de ce type de vaccins (286, 317). Sont actuellement commercialisés des vaccins contre les sérotypes 1, 2, 4, 8 et 16 du BTV sous forme monovalente ou plus récemment sous forme bivalente pour les sérotypes 2-4 et 1-8. Les deux vaccins monovalents (sérototype 2 et sérototype 16), ainsi qu'un bivalent 2 et 4, ont été utilisés pour certains d'entre eux en Corse, en Espagne, au Portugal, et en Italie (293). Les vaccins BTV-8 et BTV-1 sont utilisés en Europe depuis 2007. Globalement, sur la base d'essais en conditions expérimentales, ces vaccins ont une indication de protection clinique et pour certains d'entre eux de protection virologique. Toutefois l'interprétation des résultats dépend en grande partie de la capacité à induire une pathologie sévère dans le groupe contrôle non vacciné après inoculation d'épreuve avec une souche virulente de BTV. Toutes les publications ne sont pas égales sur ce point. Sur le terrain, lors de la campagne de vaccination de 2008-2010, l'utilisation massive des vaccins BTV-8 a permis une réduction drastique de l'évolution de la FCO (97), même si l'immunité naturelle a aussi joué un rôle non négligeable. Ces vaccins représentent actuellement le meilleur compromis entre sûreté et efficacité.

Ces vaccins inactivés présentent tout de même quelques inconvénients :

- Tout d'abord ils sont coûteux à la production par la nécessité d'avoir des doses importantes d'antigène purifié et par la nécessité d'utiliser des adjuvants associés. Par ailleurs deux injections sont généralement nécessaires pour une primovaccination. Enfin l'absence de protection croisée entre les sérotypes impose plusieurs vaccinations ou l'utilisation de vaccins multivalents dans les régions où existent différents sérotypes. Des vaccins bivalents existent (à un coût de production élevé), par contre la production de vaccins inactivés contre plus de 3 sérotypes reste hypothétique.
- La durée de l'immunité protectrice induite par ces vaccins n'est pas encore clairement définie, un an au minimum.
- De plus ces vaccins pourraient être responsables d'une sensibilisation de l'animal et d'effets secondaires. De la mortalité a ainsi été observée en Espagne, chez des moutons vaccinés simultanément contre le BTV-1 et 8 (Zulvac 1 et 8, Fort Dodge) (126).
- La réponse humorale engendrée par ces vaccins permet difficilement d'envisager une stratégie DIVA. Des essais ont été réalisés pour différencier animaux infectés et vaccinés sur la base d'une réponse en anticorps contre les protéines non structurales, supposées ne pas être présentes dans les virus inactivés et purifiés. Ces essais ne sont pas concluants à l'heure actuelle.

## 2. Vaccins dits "de nouvelle génération"

Au bilan, d'énormes progrès ont été réalisés ces dernières années en termes de vaccination contre la FCO. Il ressort actuellement qu'un vaccin idéal doit être sûr, peu onéreux, capable de permettre une stratégie DIVA et doit induire, si possible après une injection, une immunité protectrice humorale et cellulaire efficace contre plusieurs sérotypes.

Pour y répondre, de nouvelles approches vaccinales, qui reposent sur l'utilisation d'ADN recombinant, ont été développées ces dernières années. Ces approches ont nécessité une meilleure connaissance des protéines immunogènes du BTV, principalement VP2, VP3, VP5, VP7, NS1, NS3 et le développement de nouveaux systèmes d'expression de ces protéines d'intérêt. Les deux systèmes les plus utilisés sont le baculovirus et les poxvirus recombinants.

### 2.1. Les pseudoparticules virales produites en système baculovirus

Cette approche a consisté à faire exprimer les protéines structurales immunogènes majeures du BTV dans un système qui permet l'assemblage et la formation de structures tridimensionnelles similaires aux particules virales mais sans contenir de matériel génétique (116, 117). Dans les cellules d'insecte, l'expression et l'auto-assemblage de VP3 et VP7 par un baculovirus a permis la formation d'une capsid interne ou core-like particule (CLP) (260). Si les protéines VP2 et VP5 sont exprimées en plus de VP3 et VP7, les deux capsides sont reproduites et forment une pseudoparticule virale ou virus-like particule (VLP) (280).

Les réponses immunitaires contre ces protéines synthétiques ont été évaluées *in vitro* et au cours d'expérimentations animales (274, 275, 277, 280, 337). Brièvement deux immunisations successives permettent l'induction d'une réponse en anticorps neutralisants mais aussi d'une réponse immunitaire cellulaire LTh et CTL. Des candidats vaccins utilisant des VLP ou uniquement les protéines VP3 et VP7 des CLP, ont donné des résultats

prometteurs en procurant une protection totale contre une inoculation d'épreuve homologe et partielle contre une inoculation d'épreuve hétérospécifique (260, 277).

Les VLP sont des outils prometteurs pour générer des vaccins multivalents contre la FCO, car les protéines VP2 de plusieurs sérotypes peuvent être produites en même temps (278). Il a été démontré qu'un mélange de VP2 du BTV de sérotypes 10 et 17 induisaient une bonne protection contre une inoculation d'épreuve de BTV homologe (BTV-10 et BTV-17) mais seulement une protection partielle contre une inoculation d'épreuve de BTV hétérologue (BTV-4) (278, 280). Par ailleurs, les VLP sont très immunogènes même à faibles doses et sont considérées comme naturellement sûres. En l'absence de matériel génétique, il n'y a pas de répllication possible, pas plus que de réversion ou de réassortiment. De plus, ces vaccins VLP s'inscrivent parfaitement dans la stratégie DIVA, car seuls les gènes structuraux sont exprimés. Par conséquent les animaux vaccinés seront dépourvus d'anticorps dirigés contre les protéines non exprimées dans le vecteur recombinant alors qu'ils sont détectables chez les animaux infectés. Toutefois ces vaccins présentent aussi certains inconvénients. En effet, ils peuvent être contaminés par du baculovirus sauvage (140), avec un risque potentiel d'infection des *Culicoides* lors de leurs repas sanguins sur des animaux vaccinés. Leur fabrication est complexe, ils sont peu stables, ce qui rend leur commercialisation difficile. Une étude récente a néanmoins permis d'améliorer leur stabilité et de diminuer la complexité des stratégies de clonages avec la construction d'un plasmide dans lequel VP3 et VP7, les protéines structurales les plus conservées, sont pré-intégrées et les protéines VP2 et VP5 de différents sérotypes ajoutées par la suite. Les animaux vaccinés avec de telles VLP, ont été complètement protégés contre une inoculation d'épreuve par du BTV homologe (315).

## 2.2. Vecteurs recombinants

Depuis quelques années, les principaux vecteurs utilisés pour les essais vaccinaux contre la FCO, sont les poxvirus, car comme nous l'avons vu précédemment, ces virus permettent un bon compromis entre innocuité et immunogénicité. Parmi les poxvirus, le VACV a été le premier testé avec succès chez le mouton (197). Trois immunisations successives à 21 jours d'intervalle chez des moutons, avec des VACV exprimant uniquement VP2 (VACV-VP2), ou uniquement VP5 (VACV-VP5) ou les deux protéines combinées (VACV-VP2+VP5) du BTV-1, ont permis d'induire une réponse en anticorps neutralisants dans les trois conditions (197). Les anticorps neutralisants étaient présents en plus grande quantité pour le VACV-VP2+VP5 par rapport aux VACV-VP2 ou VACV-VP5, suggérant l'intérêt d'inclure les deux antigènes dans un vaccin recombinant contre le BTV. Toutefois lors d'une inoculation d'épreuve le VACV-VP2 a protégé les 6 animaux inoculés alors que seuls quatre animaux sur six immunisés avec le VACV-VP2+5 étaient protégés (197).

Plus récemment deux vecteurs poxvirus ont été utilisés comme vecteurs vaccinaux contre la FCO, un vecteur non répliquatif chez les ruminants, le canaripoxvirus, et un vecteur répliquatif, le capripoxvirus. Boone et al, ont montré qu'un recombinant canaripoxvirus exprimant des gènes synthétiques optimisés pour la VP2 et la VP5 pouvait induire une protection clinique et virologique efficace contre une inoculation d'épreuve homologe du BTV (BTV-17), après deux injections à 22 jours d'intervalle chez des moutons. Le vecteur canaripoxvirus non répliquatif est utilisé en toute sécurité et dans le monde entier comme vaccin contre la leucémie féline (326). Toutefois, il est probable que ce type de vaccin ne confère qu'une protection spécifique du sérotype. Le principe du capripoxvirus est de vacciner simultanément et en une seule fois contre une maladie d'intérêt et contre les varioles ovines (clavelée) et caprine dans des régions régulièrement touchées par ces maladies. Le capripoxvirus a ainsi été utilisé pour exprimer différentes protéines immunogènes du BTV. Des essais vaccinaux ont été réalisés en

1996 avec un capripoxvirus exprimant la protéine VP7 du BTV (346). Ils ont permis une protection satisfaisante contre une inoculation d'épreuve faiblement virulente de BVT-1 homologue et une protection partielle (6 animaux sur 8) contre une inoculation d'épreuve de BTV-3 hétérologue (cf paragraphe 1.2.) (346). Plus récemment, l'injection d'un mélange de capripoxvirus recombinants exprimant VP2, VP7, NS1 et NS3 du BTV-2 chez des moutons, a entraîné une séroconversion des animaux contre VP2, VP7, NS3 (262). Néanmoins, suite à une inoculation d'épreuve avec du BTV-2 homologue, seule une protection partielle a pu être observée (262).

En bilan, les vecteurs recombinants peuvent fournir une immunité protectrice aux propriétés DIVA, mais leur efficacité nécessite encore plusieurs injections pour une protection à long terme. Pour être efficaces, ils doivent permettre à la fois l'expression en grandes quantités des protéines immunogènes du BTV, pour générer une forte immunité protectrice. Leur utilisation comme vaccins DIVA multisérotypes est encore hypothétique. Notons qu'actuellement les adénovirus sont aussi envisagés comme vecteurs vaccinaux contre la FCO.

### **2.3. Vaccin suicide ou DISC (Disabled infectious single cycle)**

En 2008, la technique de génétique inverse a été publiée pour le virus du BTV (33). Le principe est de pouvoir produire du BTV infectieux par transfection des ARN génomiques sous forme monocaténaire, préalablement synthétisés et coiffés *in vitro* à partir de plasmides. Cette technique permet ainsi d'introduire de manière spécifique des mutations, des insertions ou des délétions dans les localisations précises du génome viral. Elle va permettre de mieux étudier le rôle de chaque gène et de son produit d'expression dans la pathogénie virale et ainsi de pouvoir créer des candidats vaccins atténués, sélectionnés pour leur absence d'effets secondaires. Cette méthode a récemment été mise à profit dans le cadre de la vaccination FCO via la création d'un nouveau type de vaccin, le vaccin suicide ou DISC (Disabled Infectious

Single Cycle). Le vaccin DISC repose sur l'utilisation de BTV, à qui on a délété un ou plusieurs gènes essentiels à sa réplication (279). Ce virus modifié est alors amplifié dans un système cellulaire complétement en trans la ou les protéines virales essentielles. La souche vaccinale produite est phénotypiquement complète car elle présente toutes les protéines virales mais génotypiquement délétée d'un ou de plusieurs gènes essentiels. Inoculée chez l'animal, ces virus ne peuvent réaliser qu'un cycle de réplication non productif dans les cellules, sans possibilité ultérieure de se répliquer chez l'hôte. Par contre la production des protéines virales doit permettre l'induction d'une réponse immunitaire. Très récemment, un virus mutant BTV-1 délété d'une partie de la séquence codant pour la protéine VP6 a été inoculé à des moutons (215). Tous les animaux immunisés avec ce virus DISC, ont séroconverti après la première injection et ont développé des anticorps neutralisants. Après une inoculation d'épreuve avec un BTV homologue, une protection virologique a été observée, et ceci aussi bien chez les animaux ayant été immunisés deux fois que chez les animaux ayant eu une seule injection ( $10^8$ PFU/ mouton). La protection clinique n'a pas été évaluée dans cette étude. D'autre part, les auteurs ont aussi montré, qu'à partir d'un même mutant BTV-1 déficient en VP6, il est possible de créer rapidement un autre mutant en remplaçant les séquences codant pour les protéines VP2 et VP5 du BTV-1, par celles provenant du virus BTV-8 (mutant BVT1/BTV8 déficient en VP6). Les animaux immunisés avec ce nouveau mutant, ont séroconverti après une première immunisation et la réponse anticorps a été amplifiée après la seconde immunisation. Contre une inoculation d'épreuve avec du BTV-8, l'immunisation avec le mutant VP6 déficient BTV1/BTV8 a induit une réponse humorale et une protection virologique (215).



# **OBJECTIFS DU TRAVAIL**



L'utilisation du MYXV en tant que vecteur vaccinal chez une espèce non hôte, les ruminants, implique différentes étapes de validation qui visent à démontrer l'innocuité du vecteur chez l'espèce cible et son efficacité à stimuler une réponse immune protectrice dans un modèle infectieux. L'innocuité du MYXV chez les ruminants repose sur son caractère non répliatif et son absence de pouvoir pathogène local après administration aux animaux. Le MYXV est restreint aux *Leporidae in vivo* (106). Toutefois le virus est capable de se répliquer *in vitro* dans certaines cellules cancéreuses humaines (320).

Au laboratoire, des études *in vitro* ont été réalisées sur cellules bovines et ovines. Il a été ainsi démontré que le MYXV, aussi bien la souche T1 que la souche vaccinale SG33, était non répliatif dans les lignées cellulaires (KOP-R, BT et MDBK), les fibroblastes primaires ainsi que dans les PBMCs, qu'elles soient activées ou non, et ce aussi bien chez les ovins que les bovins. L'activation des PBMCs semble favoriser l'infection puisque le pourcentage de lymphocytes infectés est plus élevé lorsque les lymphocytes sont activés par des activateurs chimiques (265).

Par ailleurs, lors d'une première étude d'injection à des moutons par voie intradermique d'un MYXV recombinant exprimant la protéine VP60 du virus RHDV, aucun effet secondaire n'a pu être décelé au site d'injection et aucun signe clinique n'a pu être observé. A partir de 48h, un infiltrat majoritairement composé de cellules mononucléées a été observé au site d'injection, indiquant le développement d'une réponse inflammatoire localisée. Le virus est capable d'infecter des cellules du derme dont la morphologie est de type macrophages ou cellules dendritiques. Toutefois il a été démontré une absence de répliation locale du MYXV et une absence totale de virémie (264). L'ensemble de ces résultats indiquerait une sûreté d'emploi du MYXV chez les ruminants.

L'efficacité du vecteur MYXV peut être étudiée sous différents angles scientifiques. *In vitro* l'étude des interactions entre cellules de l'immunité et le MYXV doit permettre une pré-

validation du modèle et par la suite d'orienter les recherches. Des études préalables d'interactions entre le MYXV et les PBMCs ont montré que les LT, et surtout les LB, sont les principales cibles du MYXV (264). Les LB faisant partie des cellules présentatrices d'antigènes, les LB infectés pourraient favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique et éventuellement protectrice. Néanmoins, la qualité d'expression, la présentation des antigènes et leur prise en charge par les cellules présentatrices d'antigènes sont encore mal connues. C'est pourquoi afin de mieux comprendre les mécanismes qui initient une réponse immune induite par la vaccination chez le mouton avec un MYXV recombiné, nous avons, dans un premier temps, envisagé l'étude des interactions entre le virus SG33 et les cellules dendritiques ovines générées *in vitro*.

La preuve de l'efficacité d'un candidat vaccin repose, *in fine*, sur la démonstration de sa capacité à protéger les animaux immunisés contre une inoculation d'épreuve efficace. Une étude d'inoculation intradermique de MYXV recombiné exprimant la protéine VP60 du virus RHDV) à des moutons, a montré que le MYXV est capable d'induire une réponse en anticorps neutralisants la protéine de capsid VP60 (264). Toutefois il n'a jamais été démontré de protection vaccinale avec le système MYXV chez les ruminants. Dans une deuxième partie nous avons donc construit des virus recombinants SG33 exprimant différents antigènes du virus de la bluetongue et évalué leur capacité à protéger des moutons contre une inoculation d'épreuve à BTV.

# ÉTUDES EXPÉRIMENTALES



## I. Interactions entre les cellules dendritiques et le MYXV

### A. Introduction

Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigène, elles jouent un rôle pivot dans la mise en place à la fois de la réponse innée mais aussi de la réponse adaptative. Elles sont présentes au niveau périphérique notamment dans la peau, à proximité des sites classiquement utilisés pour l'injection de vaccin (voies sous-cutanée ou intradermique). Ces cellules sont peu nombreuses dans l'organisme, il est donc difficile de les obtenir en grand nombre à partir du sang, des nœuds lymphatiques ou encore des tissus. Ainsi plusieurs protocoles de différenciation *in vitro* ont été proposés à partir de différents précurseurs, comme les monocytes (Mo-DC) (287, 295) ou encore de cellules progénitrices obtenues à partir de la moelle osseuse (BM-DC) (155).

Pour les ovins, un protocole de différenciation de DC à partir de précurseurs de la moelle osseuse en présence de GM-CSF ovin a été mis au point au laboratoire. Plusieurs populations de DC sont obtenues avec ce protocole, dont deux sont majoritaires et peuvent être distinguées grâce à leur morphologie et à l'expression des marqueurs CD11b, CMH-II et CD207 (langerine) : les cellules de type Langerhans ( $CD11b^{dull}$ ,  $CMH-II^{high}$ ,  $CD207+$ ) et les cellules de types Mo-CD ( $CD11b^{int/high}$ ,  $CMH-II^{low}$ ,  $CD207^-$ ) (113).

Dans ce travail, nous avons étudié la réponse des DC, différenciées à partir des précurseurs de la moelle osseuse, à l'infection par le MYXV. Afin d'étudier les interactions entre les DC et le MYXV, nous avons construit un virus recombiné exprimant la protéine GFP (SG33-GFP). Nous avons ainsi évalué la capacité des cellules dendritiques infectées par le SG33-GFP à maturer et exprimer des gènes impliqués dans la mise en place de la réponse adaptative.

### B. Article I

## Infection of Nonhost Species Dendritic Cells *In Vitro* with an Attenuated Myxoma Virus Induces Gene Expression That Predicts Its Efficacy as a Vaccine Vector

S. Top, E. Foulon, B. Pignolet, M. Deplanche, C. Caubet, C. Tasca, S. Bertagnoli, G. Meyer and G. Foucras  
*J. Virol.* 2011, 85(24):12982. DOI: 10.1128/JVI.00128-11.  
Published Ahead of Print 10 August 2011.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jvi.asm.org/content/85/24/12982>

---

### SUPPLEMENTAL MATERIAL

*These include:*

<http://jvi.asm.org/content/suppl/2011/11/14/85.24.12982.DC1.html>

### REFERENCES

This article cites 72 articles, 24 of which can be accessed free at: <http://jvi.asm.org/content/85/24/12982#ref-list-1>

### CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://jvi.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

## Infection of Nonhost Species Dendritic Cells *In Vitro* with an Attenuated Myxoma Virus Induces Gene Expression That Predicts Its Efficacy as a Vaccine Vector<sup>∇†</sup>

S. Top,<sup>1,2</sup> E. Foulon,<sup>1,2</sup> B. Pignolet,<sup>1,2</sup>§ M. Deplanche,<sup>1,2</sup> C. Caubet,<sup>1,2</sup> C. Tasca,<sup>1,2</sup> S. Bertagnoli,<sup>1,2</sup> G. Meyer,<sup>1,2</sup> and G. Foucras<sup>1,2\*</sup>

Université de Toulouse, ENVT, IHAP, 31076 Toulouse Cedex 03, France,<sup>1</sup> and INRA, IHAP, 31076 Toulouse Cedex 03, France<sup>2</sup>

Received 19 January 2011/Accepted 29 July 2011

**Recombinant myxoma virus (MYXV) can be produced without a loss of infectivity, and its highly specific host range makes it an ideal vaccine vector candidate, although careful examination of its interaction with the immune system is necessary. Similar to rabbit bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs), ovine dendritic cells can be infected by SG33, a MYXV vaccine strain, and support recombinant antigen expression. The frequency of infected cells in the nonhost was lower and the virus cycle was abortive in these cell types. Among BM-DC subpopulations, Langerhans cell-like DCs were preferentially infected at low multiplicities of infection. Interestingly, ovine BM-DCs remained susceptible to MYXV after maturation, although apoptosis occurred shortly after infection as a function of the virus titer. When gene expression was assessed in infected BM-DC cultures, type I interferon (IFN)-related and inflammatory genes were strongly upregulated. DC gene expression profiles were compared with the profiles produced by other poxviruses in interaction with DCs, but very few commonalities were found, although genes that were previously shown to predict vaccine efficacy were present. Collectively, these data support the idea that MYXV permits efficient priming of adaptive immune responses and should be considered a promising vaccine vector along with other poxviruses.**

Recombinant poxviruses are undergoing intensive evaluation as vaccine candidates for a variety of pathogens. Poxviruses are known for their ability to induce strong immunity against their own proteins and against recombinant proteins when genes of interest are introduced into the viral genome (45). Numerous studies involving recombinant viruses have shown that poxvirus infection can induce both T and B cell-dependent immune responses, although poxviruses have developed several strategies to escape host immunity (61). Indeed, several poxvirus vector systems are under study to develop vaccines against infectious diseases (5, 15, 24, 25, 31, 66).

In domestic animals, poxviruses have been shown to be efficient vectors for the production of protective immune responses, notably in rabbits (3), cats (41, 42), horses (27), and ruminants (8, 37, 49, 51). The development of recombinant vaccines for ruminant species should help to implement new vaccine policies and to achieve a distinction between infected and vaccinated animals.

Myxoma virus (MYXV) has already been evaluated as a vaccine vector and is under consideration for use in vaccine development in ruminants (51, 52). Host-restricted MYXV has a number of useful properties as a vaccine candidate, including safety and the ability to incorporate substantial amounts of

genetic material for the expression of foreign gene products. We have recently shown that recombinant MYXV is able to infect primary and immortalized ovine cells (52) and that the infection is not productive in this species. Moreover, MYXV-infected ovine cells support the expression of several heterologous proteins (51, 52). In addition, preliminary results demonstrated that sheep injected with MYXV expressing VP60 (the major capsid product of rabbit hemorrhagic disease virus) mount a specific antibody response against the transgene product (51).

Previously published data indicated that MYXV infects dendritic cells (DCs) during natural infection in rabbits, the host species of this virus, suggesting that DCs could be the primary site of MYXV replication (6). Moreover, we recently observed that cells identified as macrophages/dendritic cells, based on their morphology, expressed high levels of MYXV antigens upon intradermal injection of the MYXV SG33 vaccine strain in sheep (52).

DCs are the most potent antigen-presenting cells and play a crucial role during the priming and reactivation of antigen-specific immune responses (2). Following infection with a pathogen, functional changes of DCs are essential because priming and polarization of the immune response depend on these changes (18). Therefore, a better understanding of the modifications in the gene expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and stimulatory molecules may prove useful in predicting whether or not a vaccine vector will be effective. Moreover, this understanding may help to identify viral modifications that may improve vaccine efficacy (54).

To increase our understanding of these processes, interactions between ovine bone marrow-derived DCs (BM-DCs) and MYXV SG33 have been studied and the global gene profile of

\* Corresponding author. Mailing address: University of Toulouse, ENVT, IHAP, 23 Chemin des Capelles, BP 87614, F-31076 Toulouse Cedex 03, France. Phone: 33 561 193 902. Fax: 33 561 193 834. E-mail: g.foucras@envt.fr.

§ Present address: INSERM U1043, Toulouse, France, and Université Toulouse III, Paul Sabatier, Toulouse, France.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 10 August 2011.

DCs in response to MYXV infection was analyzed. Here, we show that MYXV infection induces a strong reprogramming of cells, leading to the expression of proinflammatory cytokines and mobilization of type I interferon (IFN) pathways, cell death, and features associated with the activation of the adaptive immune response.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cell lines.** Rabbit kidney cells (RK13 and ATCC CCL-17) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin.

**Generation and culture of BM-DCs.** All animals were maintained in conventional conditions and were euthanized in accordance with local regulations by anesthesia overdose (5 mg/kg of body weight ketamine followed by 15 mg/kg pentobarbital sodium). Protocols for *in vitro* generation of BM-DCs have been described elsewhere for rabbit (14) and ovine (21) cells. Briefly, bone marrow cells were harvested from the femurs and the sternums of rabbits and sheep, respectively. BM cells were obtained by scraping and were released by crushing the marrow with a syringe plunger in a petri dish filled with Hanks' balanced salt solution (HBSS) buffer. Cells were passed through a 100- $\mu$ m nylon mesh to remove small pieces of bone and debris, and red blood cells were lysed with ammonium-chloride-potassium (ACK) lysis buffer. Cells were cultured in bacteriological dishes (Falcon) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 7 to 8 days. The culture medium was RPMI 1640-Glutamax (Invitrogen) with 10% FCS, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 25 mM HEPES (Gibco-BRL), 1% nonessential amino acids, and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol. The medium was supplemented with 20 ng/ml recombinant ovine and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for ovine and rabbit BM cells, respectively. Fresh medium supplemented with the appropriate cytokine was added every 3 days.

For maturation, DCs were treated with heat-killed *Staphylococcus aureus* (Pansorbin, 20  $\mu$ g/ml; Calbiochem) a day before infection as previously described (21).

**Isolation of ovine skin DCs.** Skin DCs were isolated from ovine skin using a protocol largely based on protocols for human skin DC isolation (65). Briefly, pieces of skin were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), once in 70% ethanol, and once in complete RPMI (cRPMI) with 5% fungizone and 20  $\mu$ g/ml enrofloxacin (Baytril). The skin was incised to get a lace and incubated in cRPMI with 5 U/ml dispase (Invitrogen) for 1 h at 37°C. The skin pieces were then washed twice in cRPMI and cultured in cRPMI for 2 to 5 days. Cells were harvested, and dendritic cells were stained with Alexa 647-labeled anti-CD11c and incubated with anti-mouse IgG microbeads (Miltenyi Biotec) before separation on MS columns according to the manufacturer's recommendations.

**Viruses.** All viruses used in this study were derived from the SG33 attenuated vaccine strain of MYXV (60), modified in our laboratory. The recombinant SG33-GFP (green fluorescent protein) virus (52) contains the enhanced GFP (eGFP) gene, and the SG33-VP60 virus contains the rabbit hemorrhagic disease virus capsid VP60-encoding gene, both under the control of the strong early/late vaccinia virus p7.5 promoter inserted into the M11L-myxoma growth factor (MGF) locus. Moreover, the SG33-VP60 virus contains the *lacZ* gene under the control of the poxvirus late p11 promoter inserted in the same locus.

Viruses were purified by sucrose gradient sedimentation, and titers were determined by serial dilutions and plaque assays as previously described (10).

**Infection, growth curves, and virus titration.** For growth analysis, virus was added at a multiplicity of infection (MOI) of  $0.01 \times 10^6$  or  $1 \times 10^6$  to  $1.5 \times 10^6$  cells in 500  $\mu$ l. The virus was allowed to adsorb for 90 min at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Free virus was then removed, and cells were washed twice and recovered by centrifugation. Infected cells were cultured at  $0.3 \times 10^6$  cells per 100  $\mu$ l/well of a 96-well plate in their respective medium supplemented with 10% FCS. At each time point of interest (as indicated in the figure legends), cells were collected. To release virus from infected cells, samples were subjected to three freeze-thaw cycles.

For titration, serial dilutions of cell lysis supernatant were added to RK13 cells and adsorbed for 90 min. The inoculum was removed, and fresh medium supplemented with 5% FCS was added. After 48 h of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, the medium was removed and replaced by solid medium containing Eagle minimum essential medium (MEME) medium (Gibco-BRL) supplemented with 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2% FCS, 25 mM HEPES, 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, and 1% low melting point (LMP) agarose (Invitrogen). After 2 days, plaques were counted under microscopic examination.

**X-Gal staining and analysis.** Rabbit and ovine cells were infected with SG33-VP60 (MOIs of 0.1 and 1). Twenty-four hours after infection, cells were diluted

in PBS to a density of  $1 \times 10^6$  cells per ml. A total of  $1 \times 10^5$  cells was loaded and spun at 700 rpm for 20 min in cytospin III (Shandon). Cells were then washed twice with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde for 15 min at room temperature. After staining with 2 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O, and 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in PBS for 4 to 10 h, cells were observed under the microscope.

**Flow cytometry analysis and cell isolation.** The phenotype of ovine BM-DCs was analyzed by flow cytometry after incubation with anti-CD11c (OM1b hybridoma supernatant from I. Schwartz-Cornil, INRA, France), anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86 (from ascites, a kind gift from J. Hope, IAH, Compton, United Kingdom), anti-mouse IgG-R-phycoerythrin (RPE) or anti-mouse IgG1-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences), phycoerythrin (PE)-labeled anti-major histocompatibility class II DQ and DR (MHC-II DQ/DR) (VPM37), and A647-labeled anti-CD11b (CC126) antibodies in fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer (PBS with 0.5% bovine serum albumin [BSA] and 2.5 mM EDTA). All antibodies with the exception of unconjugated antibodies were purchased from Serotec. Dead cells were gated out using forward scatter-side scatter (FSC-SSC) profiles and propidium iodide (PI, 1  $\mu$ g/ml) or 7-AAD (5  $\mu$ l/test) (BD Pharmingen) staining. Background and autofluorescence were determined using isotype control antibody staining. Acquisition was performed on 10,000 events using a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) and CellQuestPro software. Data were analyzed with FlowJo software.

For separation, BM-DCs were harvested after 7 days of differentiation and incubated with 1  $\mu$ g/ml anti-CD11c monoclonal antibody (MAb) (clone OMI). Alternatively, cell subtypes were separated using an anti-CD11b MAb (clone CC126, Serotec). After two washes, cells were incubated with anti-mouse IgG microbeads (Miltenyi Biotec) and separated on MS columns according to the manufacturer's recommendations. The purity of the enriched fractions was assessed by flow cytometry following A647-labeled anti-CD11b/c staining on at least 10,000 events.

**Apoptosis analysis.** For apoptosis analysis,  $0.5 \times 10^6$  cells (48-well plate) were infected at various MOIs. Sixteen hours postinfection (p.i.), cells were harvested, labeled for cellular markers, and washed in PBS. The cellular concentration was then adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml in 1 $\times$  annexin V-binding buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.1  $\mu$ l of PE-labeled annexin V (Alexis) was added to 100  $\mu$ l of cells ( $10^5$  cells) and incubated at room temperature for 15 min. The reaction was stopped by the addition of 400  $\mu$ l of 1 $\times$  annexin V-binding buffer, and the cells were analyzed quickly by flow cytometry.

**RNA isolation and microarray hybridization.** BM-DCs were harvested after 7 days of differentiation and purified with mouse anti-CD11c antibodies on MS columns as described above. Purified BM-DCs were transferred into 24-well plates at  $2 \times 10^6$  cells per well and cultured overnight in 200  $\mu$ l of medium. The cells were then infected with SG33-GFP at an MOI of 1 for 0, 3, or 8 h. Total RNA was isolated using an RNeasy Minikit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, at each time point, supernatants were discarded and cells were pelleted and lysed in 350  $\mu$ l of RLT lysis buffer (Qiagen). The concentration and the RNA integrity number (RIN) were measured using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), respectively. Only RNA samples with an RIN of  $\geq 8.5$  were retained for further analysis.

A low-RNA-input fluorescent linear amplification kit (Agilent Technologies) was used to generate Cy3- and Cy5-labeled cRNA. The concentration and amount of dye incorporated were measured using the ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). After purification of the labeled cRNA, a reference sample that resulted from a pool of 500 ng of each of the samples was generated. After fragmentation, 500 ng of cRNA from each sample was hybridized along with 500 ng of the reference sample to the Agilent 019921 ovine oligonucleotide array slide (Agilent Technologies) according to a reference design without dye swap and following the manufacturer's protocol.

Slides were scanned using an Axon 4000B scanner at 5  $\mu$ m (Axon Instruments, Union City, CA) and GenePix Pro software.

**Statistical analysis of microarray data.** Raw data were normalized with LOWESS using Feature Extraction version 9.5.3.1 and were imported into GeneSpring GX11 software, both from Agilent Technologies. Statistical analysis of microarray data was carried out using a one-way analysis of variance (ANOVA) with Student-Newman-Keuls *post hoc* test for time and a Benjamini-Hochberg false discovery rate control with a threshold  $q$  of  $<0.05$ . The expression profiles for these genes were clustered over time and entities using the unsupervised hierarchical clustering of GeneSpring based on the Pearson centered gene distance.

Only 8,847 genes on this array were annotated by the Human Ortholog Gene Nomenclature Committee (HGNC) (<http://www.sigenae.org/>, sheep oligonucle-

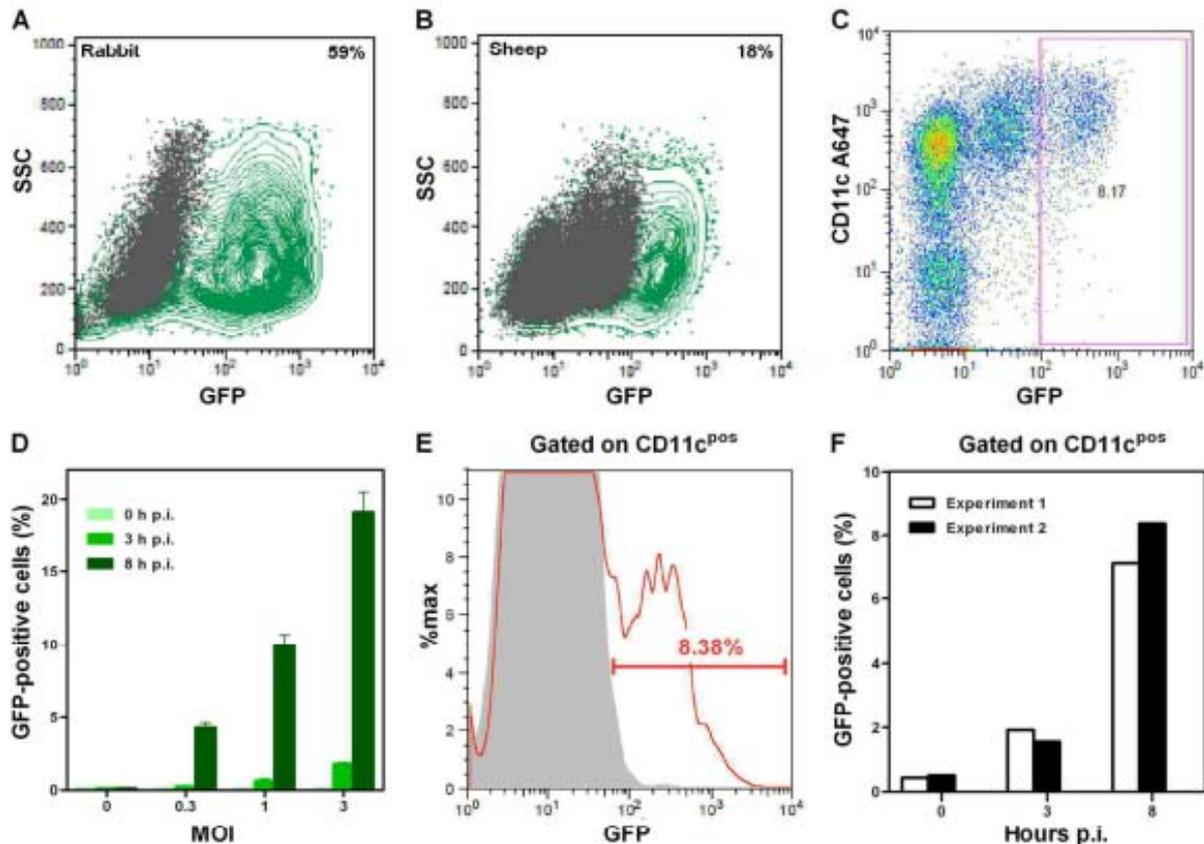


FIG. 1. MYXV infects bone marrow-derived dendritic cells from rabbit and the nonhost ovine species. *In vitro*-differentiated DCs from rabbit and sheep were produced as described in Materials and Methods. After 7 days of culture, BM-DCs were infected with SG33-GFP recombinant MYXV at an MOI of 1. (A and B) After 16 h of incubation, cells were collected and GFP-positive cells were detected by flow cytometry in rabbit (A) and ovine DCs (B). (C) GFP was detected only in ovine cells expressing the CD11c marker. (D) GFP-positive ovine cells were detected by flow cytometry 0, 3, and 8 h postinfection with SG33-GFP at different MOIs. Error bars indicate standard deviations of three independent experiments. (E) Ovine skin DCs were infected with SG33-GFP at an MOI of 1 and analyzed at 0 (gray) and 8 h p.i. (red). After 0, 3, and 8 h of infection, the percentage of GFP-positive cells was detected in skin CD11c<sup>pos</sup> DCs. (F) The results of two independent experiments are presented.

otide annotation version 5 of 10 November 2009) (9). As a consequence, only half of our list of differentially expressed (DE) probes was annotated. More information was obtained using the Basic Local Alignment Search Tool program on the NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the ENSEMBL website (<http://www.ensembl.org/index.html>).

**Biological interpretations of the focus genes.** Two software programs were used to interpret the lists of focus genes obtained from statistical analysis, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and InnateDB (38). IPA software (version 8.8; Ingenuity Systems) was used to generate biological networks from a list of selected genes and to document the functions of these genes and the canonical pathways in which they are involved.

Gene ontology (GO) analysis and identification of overrepresented pathways and transcription factor binding sites (TFBS) were performed with InnateDB (<http://www.innatedb.com>).

**RT-qPCR.** For the quantification of gene expression in infected ovine or rabbit BM-DCs, the RNA samples were assayed by reverse-transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). The RT reaction was carried out using a superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen) on 500 ng of RNA. Primers were designed with Primer 3 software (57) using publically available GenBank sequences (see Tables S1 and S2 in the supplemental material). qPCR was performed using specific primer sets for selection of genes with a fold change (FC) of >2 and iTaq SYBR green supermix with ROX dye (Bio-Rad) in a final volume of 25  $\mu$ l using a 7000 real-time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Determination of a stable reference gene was done using the GenNorm version 3.4 Microsoft Excel add-in software package (69). Assays were carried out in duplicate. PCR was performed using the following conditions: denaturation at 95°C for 2 min and 40 amplification cycles consisting of three rounds at 95°C for 15 s and 60°C for

45 s. The results were then analyzed using SDS software version 1.2. Relative gene expression levels were calculated by the threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) method [ $\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T$  (geometric mean of GAPDH, RPL19, HPRT, S26 genes)] and  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ stimulated} - \Delta C_T \text{ nonstimulated}$  using the *gapdh* (encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *rp19*, *hp19* (encoding hypoxanthine phosphoribosyltransferase), and *tps26* genes).

**Microarray data accession number.** The microarray data are available under accession no. GSE32656 in the Gene Expression Omnibus repository at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/linking.html>).

## RESULTS

**SG33 MYXV infects rabbit and ovine dendritic cells but fails to replicate in ovine cells.** To show the capacity of MYXV to infect dendritic cells, rabbit and ovine DCs were differentiated *in vitro* from bone marrow cells in the presence of human or ovine recombinant GM-CSF, respectively. On day 7, GM-CSF DCs were infected with a recombinant virus, SG33-GFP, in which eGFP was under the control of the early/late poxvirus p7.5 promoter. After 16 h of infection, we observed GFP expression in the cells from the rabbits, indicating that host species DCs are highly receptive to MYXV (Fig. 1A). Furthermore, GFP was also detected in ovine BM-DCs (Fig. 1B), albeit at lower levels than observed in rabbit DCs (18% versus

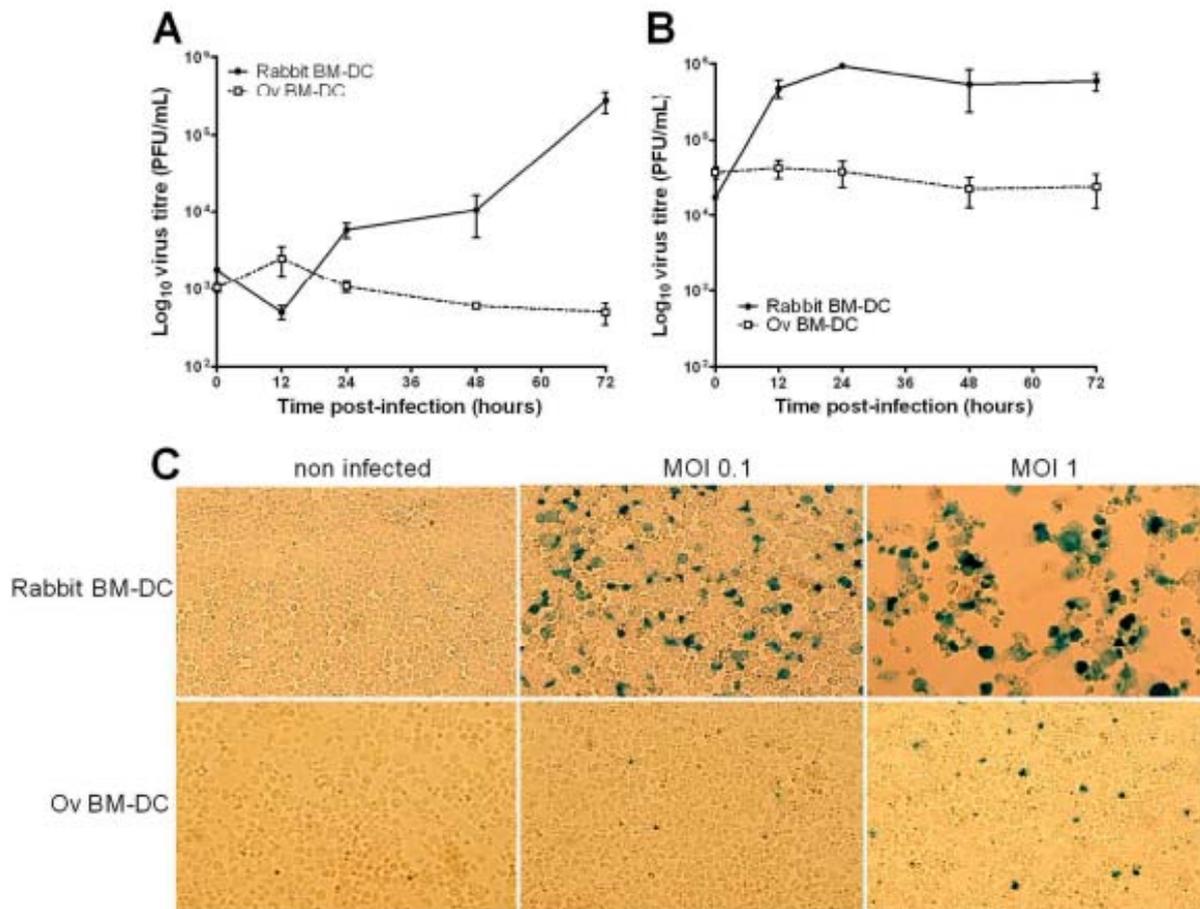


FIG. 2. Ovine (Ov) BM-DCs are not permissive to MYXV infection. (A and B) BM-DCs from both species were generated as indicated in Materials and Methods. Cells were infected with SG33 at a low (0.01) (A) or a high (1) (B) MOI. The samples were harvested to measure infectious virus at 0, 24, 48, and 72 h p.i. by titration on RK13 cells. MYXV replication was analyzed using growth curves from rabbit and ovine BM-DCs. At each time point, lysates from three different experiments were assayed by plaque production on RK13 monolayers. Error bars indicate standard deviations of three independent experiments. (C) *lacZ* gene under the control of the p11 late promoter. Rabbit and ovine BM-DCs were infected with recombinant SG33-VP60-LacZ virus, and 24 h p.i., late viral protein expression was evaluated by labeling with X-Gal.

59%). In the ovine cell culture, GFP expression was strictly limited to the CD11c-positive cells (8.17%) and was clearly absent in the CD11c-negative progenitor cells (Fig. 1C), indicating that only differentiated cells had the capacity to support MYXV infection. The MYXV infectivity of ovine DCs and their kinetics of GFP expression were carefully examined (Fig. 1D). At 8 h after infection, the proportion of GFP-positive CD11c-positive cells varied from 5% at an MOI of 0.3 to 20% at an MOI of 3. GFP expression reached a plateau at MOIs above 5, and maximum expression was observed approximately 8 h after infection (data not shown). To evaluate the receptivity of *ex vivo* DCs, we isolated DCs from the skin of sheep and infected them with SG33-GFP at an MOI of 1 (Fig. 1E and F). After 0, 3, and 8 h of culture, the percentage of GFP-positive cells within the CD11c-positive fraction increased from 2% at 3 h p.i. to 8% at 8 h p.i. (Fig. 1F), indicating that ovine skin DCs and BM-DCs are equally receptive to MYXV. As the pattern of GFP expression suggested differential receptivity of DCs from host and nonhost species, SG33 replication in rabbit and ovine BM-DCs was compared. In infection of rabbit BM-DCs at an MOI of 0.01, several rounds of replication occurred

and MYXV titers increased progressively over time. However, we did not observe an increase of MYXV titer in ovine BM-DCs (Fig. 2A). We also performed a similar experiment in which we infected DCs at an MOI of 1. Infection of rabbit BM-DCs resulted in viral growth curves that closely resembled classical poxvirus growth curves derived from susceptible cell lines, with a continuous increase of MYXV titers until they reached a titer of 6 log, while no increase in MYXV titer was observed in ovine BM-DCs (Fig. 2B). Although the ovine cells are receptive to MYXV infection, we concluded from these analyses that MYXV infection is abortive in ovine BM-DCs.

This incomplete viral cycle may be due to the lack of expression of late genes. To test this hypothesis, ovine DCs were infected with a recombinant MYXV in which *lacZ* is placed under the control of the late p11 promoter. As shown in Fig. 2C,  $\beta$ -galactosidase activity was detected in only a small number of ovine cells, suggesting that late viral gene expression is defective in ovine cells, unlike the strong expression that is observed in rabbit BM-DCs. These data show that the defect in late gene expression may jeopardize virus particle formation, leading to an abortive replication cycle in the ovine cells. Thus,

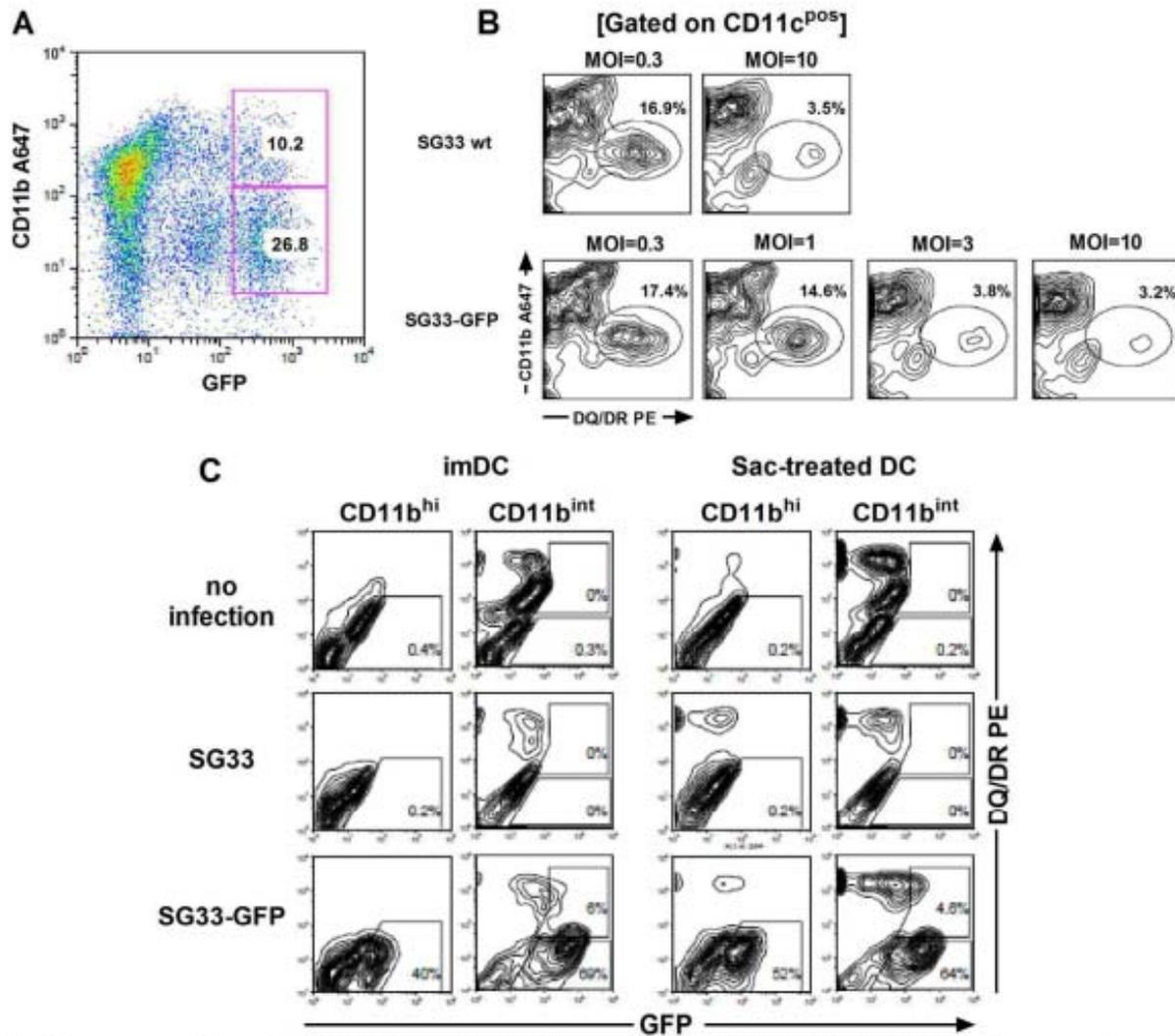


FIG. 3. Disappearance of Langerhans-like DCs, a preferred cell target of MYXV following infection. (A) DC subtypes were detected using a CD11b/MHC-II combination, and GFP expression was measured. Data are representative of at least three independent experiments. Ovine BM-DCs were infected with SG33-GFP or SG33 as described in the Fig. 1 legend. Various MOIs of SG33-GFP or SG33 were used to infect BM-DCs. GFP fluorescence was analyzed the next day to quantify the proportion of infected cells. (B) In parallel, the phenotype of recovered cells was analyzed with anti-CD11b and anti-MHC-II (DQ/DR PE) antibodies by flow cytometry. The proportion of CD11b<sup>int</sup> MHC-II<sup>hi</sup> cells decreased as the MOI increased. Langerhans cells undergo apoptosis after MYXV infection. (C) Maturation does not abrogate MYXV infection in BM-DCs. BM-DCs were matured with Sac, as verified by MHC-II upregulation. As indicated above, immature (imDC) or mature (Sac-treated) BM-DCs were infected with SG33 at an MOI of 1. The frequency of GFP-positive cells was assessed 16 h after incubation and was highly comparable between immature and mature BM-DCs. Results are representative of two experiments.

although MYXV infects ovine BM-DCs, replication is defective in this nonhost species.

**The Langerhans cell-like DC subset is more receptive to MYXV infection.** The culturing of ovine BM progenitors with GM-CSF gives rise to at least two subsets of BM-DCs that can be distinguished on the basis of their CD11b and MHC-II expression (21), monocyte (Mo)-like (CD11b<sup>hi</sup> MHC-II<sup>lo</sup>) and Langerhans cell (LC)-like (CD11b<sup>int</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) DCs. Among these two populations, a higher rate of GFP expression was observed in LC-like DCs than in Mo-like DCs (26.8% versus 10.2%, respectively) (Fig. 3A). The LC-like DC population shares some features with DCs found in the skin. Moreover, we noticed that following overnight culture, the proportion of CD11b<sup>int</sup> MHC-II<sup>hi</sup> DCs decreased as the MOI increased (Fig.

3B). The same phenomenon was observed with wild-type SG33, excluding a role for the antiapoptotic M11L gene that was deleted upon GFP insertion. To definitively assess the receptivity of both DC subtypes to MYXV infection and to evaluate the effects of DC maturation, the two DC populations were sorted and then left untreated or treated with maturation stimuli, after which they were infected. After 16 h of incubation with Sac, the upregulation of MHC-II (Fig. 3C) and CD40, -80, and -86 costimulatory markers was evident (40 to 60% increase) (data not shown), indicating that cells were strongly activated and mature (21). Although the expression of GFP was equivalent with or without maturation, the GFP signal over background was always higher in the CD11b<sup>int</sup> cells (Fig. 3C, left panel). Furthermore, the proportion of MHC-II<sup>hi</sup>

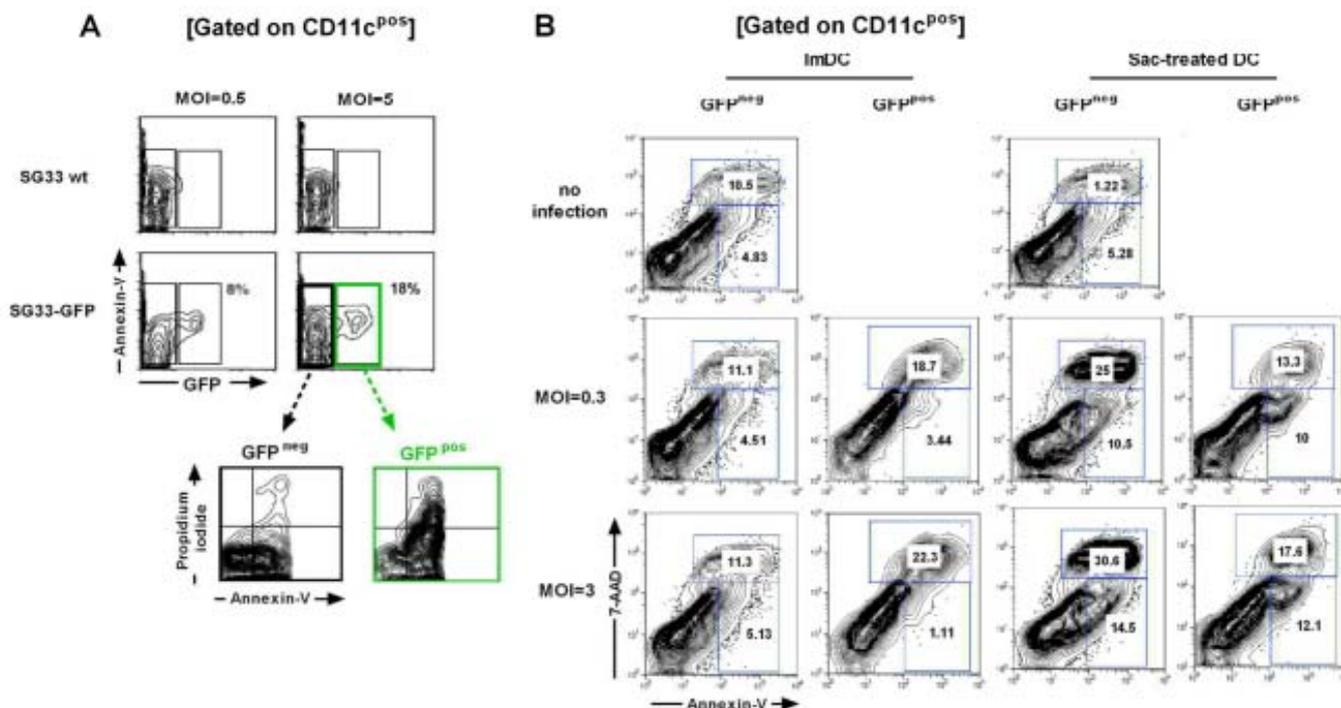


FIG. 4. The maturation state has a strong effect on the susceptibility of BM-DCs to viral cytopathic effects. (A) Ovine BM-DCs were infected with SG33-GFP at a low (0.5) and a high (5) MOI. After overnight infection, cells were stained with PE-annexin V and propidium iodide before FACS analysis. Infected cells (GFP<sup>pos</sup>) bound high levels of annexin V compared to its binding by uninfected cells (GFP<sup>neg</sup>). PI-positive, annexin V-positive cells were more abundant in the GFP-positive subsets, indicating that secondary necrosis developed after MYXV infection. wt, wild type. (B) Immature (ImDC) or mature ovine BM-DCs (treated with Sac) were infected with SG33-GFP at a low (0.3) or high (3) MOI. After overnight infection, cells were stained with PE-annexin V and 7-AAD before FACS analysis. Higher levels of annexin V binding and a higher proportion of dead cells (7-AAD<sup>pos</sup>) were observed in matured, Sac-treated DCs.

CD11b<sup>int</sup> cells was strongly diminished following overnight culture, suggesting that MYXV induces cell death in these cells irrespective of their maturation state, as observed by the results in Fig. 3B.

To determine whether this cell death is linked to apoptosis induced by MYXV, as reported for other poxviruses, we stained BM-DCs with annexin V that binds to phosphatidylserine on the surface of cells undergoing early apoptosis. Propidium iodide or 7-AAD was also used to detect necrotic cells. Increased annexin V was detected on the surface of GFP-positive DCs, indicating that these cells were undergoing apoptosis 16 h after infection (Fig. 4A). An increase in annexin V binding was also noticed on GFP-negative cells, indicating that a bystander apoptosis of noninfected cells was also occurring. These data indicate that MYXV induces apoptosis not only in a subpopulation of DCs that are more susceptible to MYXV infection but also in neighboring uninfected cells.

**MYXV induces low levels of DC maturation.** In order to investigate the susceptibility of immature and mature ovine BM-DCs to viral cytopathic effects, the maturation of BM-DCs was induced as described above and then cell viability was measured. After infection with SG33-GFP at low (0.3) or high (3) MOIs (Fig. 4B), cells were stained with annexin V and 7-AAD. As previously described, at the same MOI, the percentage of GFP-positive cells was similar between mature and immature BM-DCs. Nevertheless, the maturation state had a strong effect on the susceptibility of BM-DCs to viral cyto-

pathic effects, as a higher level of annexin V and a higher proportion of dead cells (7-AAD-positive) were observed in mature Sac-treated DCs (30% compared to 10% in immature DCs).

We have shown that maturation does not abrogate the ability of MYXV to infect ovine DCs, as matured cells remained receptive to MYXV. We next evaluated the effect of MYXV infection on BM-DC maturation. For this, BM-DC cultures were infected with various MOIs of SG33-GFP. After 16 h of culture, the levels of costimulatory CD40, CD80, and CD86 molecules were largely unchanged on the surface of both GFP-positive and GFP-negative cells (Fig. 5A). The expression levels of these molecules were very similar to those measured in uninfected cultures, with an increase of less than 10% (Fig. 5B). The upregulation of MHC-II was also minimal following infection. In conclusion, DC maturation does not affect the capacity of MYXV to infect DCs, and MYXV infection alone induces little BM-DC maturation.

**Gene expression profiling of MYXV-infected DCs indicates a strong upregulation of type I IFN-related pathways.** To gain a global view of the gene expression changes induced by MYXV, we infected BM-DCs from three sheep with this virus and performed microarray analysis. Measurement of the RNA integrity number of samples from these sheep indicated lower values (<7.5) for higher MOI conditions (MOI of 3) and later time points. For that reason, transcriptional profiling using an ovine-specific microarray was performed on samples from

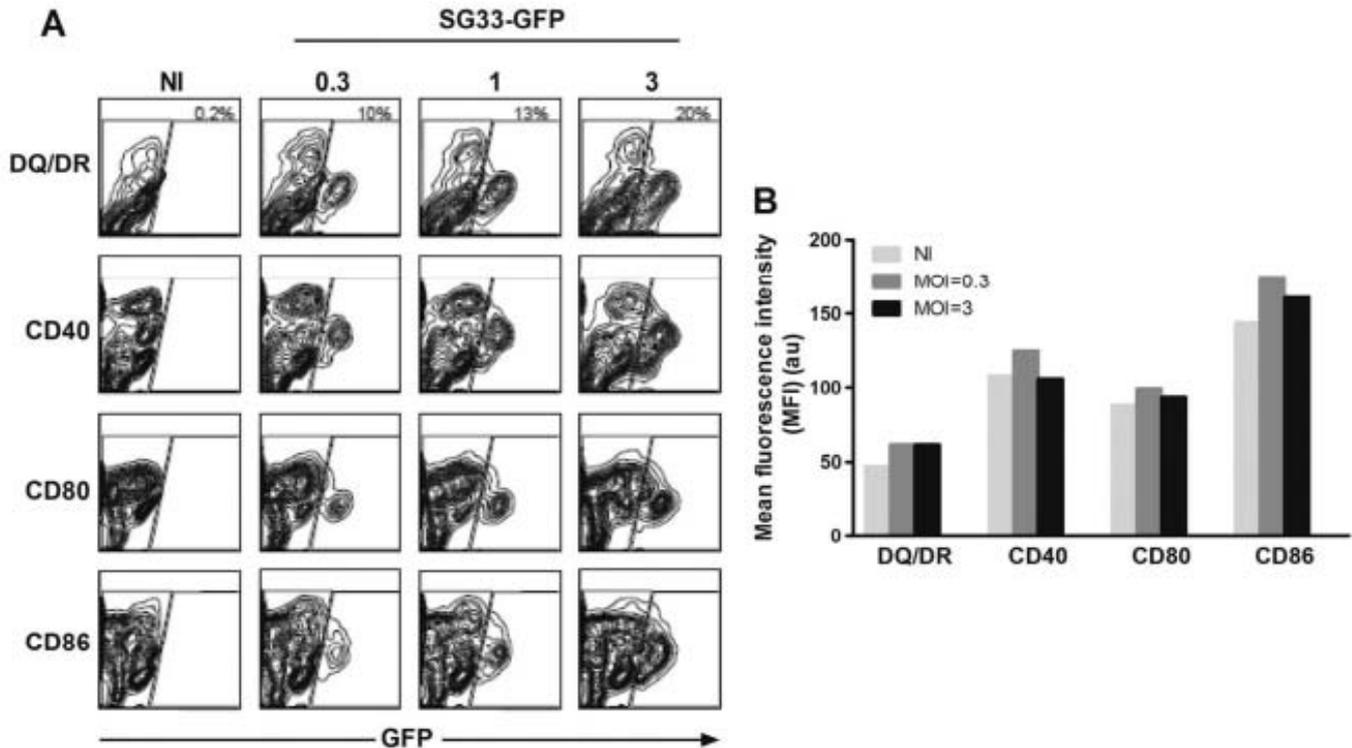


FIG. 5. MYXV infection induces poor BM-DC maturation. (A) After infection with titrated amounts of SG33-GFP (MOIs from 0.3 to 3), MHC-II DQ/DR and CD40, CD80, and CD86 costimulatory molecule expression was assessed by flow cytometry on GFP-positive and GFP-negative BM-DCs. NI, noninfected. (B) The MFI (mean fluorescence intensity) of each costimulatory molecule is indicated (au, arbitrary units). The expression of maturation markers did not differ between the two populations, and it was not different from that in the uninfected culture, indicating that MYXV induces little maturation of BM-DCs.

early time points (0, 3, and 8 h) at an MOI of 0 or 1. The differential expression of genes over time was assessed for statistical significance with one-way analysis of variance (ANOVA), using a Benjamini-Hochberg false discovery rate of 5% and a fold change (FC) greater than 1.5. This resulted in an annotated list of 390 genes modulated over the 8-h time course, with 233 and 157 genes up- and downregulated, respectively (see Table S3 in the supplemental material). Hierarchical clustering (Pearson centered) allowed the generation of a heat map representation, from which it was evident that infection induced small transcriptome changes during the first 3 h (Fig. 6A and data not shown). In contrast, large changes in gene expression occurred after 8 h. Moreover, when an FC of  $\geq 5$  was applied, a list of 54 genes was obtained, of which all except two were strongly and uniformly upregulated at 8 h (Fig. 6A). Further analysis was focused on data from the 8-h time point.

To confirm these results, RT-qPCR analyses were performed on the same RNA samples, and 28 genes from the list of the most up- or downregulated genes were measured (Fig. 6B, top table). A high correlation was observed between the results of both approaches, with a regression coefficient of  $r = 0.97$ , validating the microarray results. Several genes coding for cytokines with T cell-polarizing capabilities were also assessed, and the transcription of genes such as *ifna*, *il10*, *il12p35*, *il12p40*, *il15*, and *il18* was strongly upregulated following infection (Fig. 6B, bottom table). In Fig. 7, a comparison of the gene expression of rabbit and ovine BM-DCs is shown. These results

indicate that genes involved in type I IFN signaling pathways, such as *cxcl10*, *isg15*, *oas1*, *mx1*, *irf3*, and *irf7*, are upregulated in both species. Interestingly, *il10* and *isg15*, respectively, were 7- and 4-fold more highly expressed in ovine than in rabbit DCs, whereas *cxcl10* and *oas1* were 22- and 16-fold more highly expressed in rabbit cells.

To gain further insight into the list of 350 genes ( $q$  value  $< 0.05$  and FC  $> 2$ ), the Human Genome Organization (HUGO) gene names were imported into Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software for gene function analysis. Several functions were statistically affected (Fig. 8A to D). Most systemic functions (Fig. 8A) were related to the humoral immune response and antimicrobial and inflammatory responses. For cellular functions (Fig. 8B), the three most significant functions that were influenced were cell death, cellular growth and proliferation, and cellular development. For cell metabolism (Fig. 8C), carbohydrate metabolism, gene expression, and DNA replication recombination and repair functions were identified, probably related to hijacking of the cellular machinery by viral proteins. The most significantly influenced pathways were type I interferon signaling, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, and activation of interferon regulatory factor (IRF) by cytosolic pattern recognition receptors, with  $P$  values of  $4.1 \times 10^{-6}$ ,  $7.6 \times 10^{-5}$ , and  $1.3 \times 10^{-4}$  and gene ratios of 23.3, 10.3, and 10.8% (Fig. 8D). InnateDB analysis largely confirmed these observations (data not shown). The gene list was separated into up- and downregulated gene lists. For upregulated genes, the significant gene ontology biological

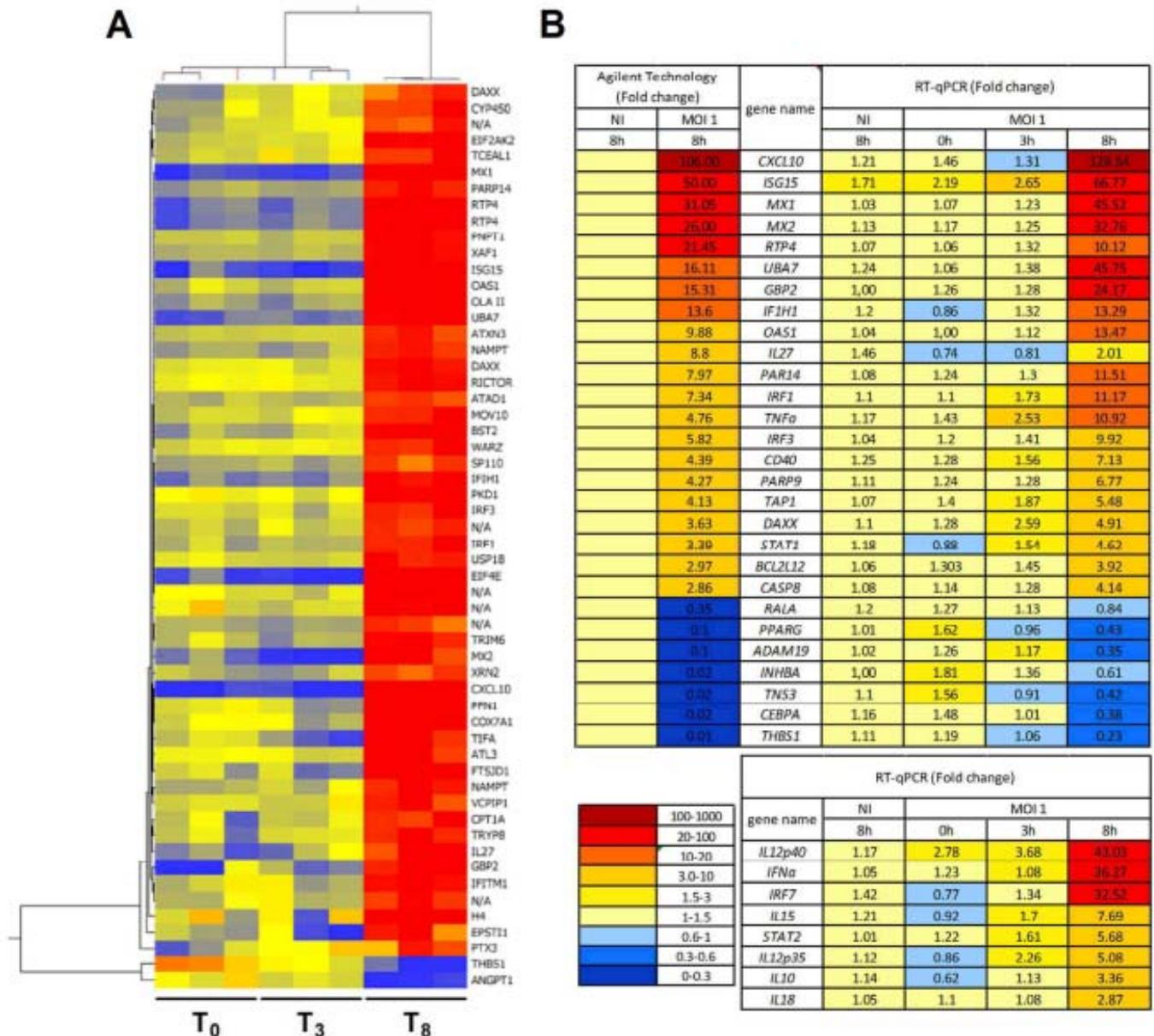


FIG. 6. Heat map representation of differentially expressed probes in response to SG33-GFP infection. (A) Each column represents a sample, and each row represents a gene. Levels of gene expression are indicated on a color scale with red corresponding to the highest level of expression and blue corresponding to the lowest level. DCs were infected with SG33-GFP at an MOI of 1 and incubated for 0, 3, and 8 h. (B) The top table shows 28 genes whose differential expression was confirmed by RT-qPCR, and in the bottom table are 8 genes encoding major cytokines that were shown to be upregulated.

pathway (GO BP) terms were Response to virus, mRNA catabolic process, and Response to IFN- $\gamma$ . The significant pathways were RIG-I-like receptor signaling pathway, Death receptor signaling, and Extrinsic pathway for apoptosis, confirming the previous results that identified programmed cell death in the IPA analysis (data not shown). For downregulated genes, the information on the pathways that were regulated was more sparse, as protein amino acid N-linked glycosylation and protein polymerization were the only GO BP terms identified.

Transcription factor binding sites (TFBS) for IRF-8 were significantly overrepresented within the list of upregulated

genes, and none of these sites was found among the downregulated genes (data not shown).

**The transcriptome profile of DC-MYXV interactions is essentially different from other DC-poxvirus interactions.** Several reports analyzing interactions of poxviruses with human DCs have previously been published. Hence, our gene profile was compared with the gene profiles induced by the attenuated forms of vaccinia virus (VACV) called MVA and NYVAC (26) and the canarypox virus ALVAC (28) in human DCs. Comparisons were made with a Venn diagram to identify genes in common between the four data sets. Surprisingly, although the analyses revealed some commonalities, the profiles were

Rabbit DCs				gene name	Ovine DCs			
NI	MOI 1				NI	MOI 1		
8h	0h	3h	8h		8h	0h	3h	8h
1.04	1.64	22.95	2721.5	<i>CXCL10</i>	1.21	1.46	1.31	128.54
1.00	1.14	2.11	218.07	<i>OAS1</i>	1.04	1.00	1.12	13.47
1.00	1.2	0.98	64.86	<i>MX1</i>	1.03	1.07	1.23	45.52
1.03	1.18	1.01	17.98	<i>IRF7</i>	1.42	0.77	1.34	32.52
2.12	5.34	5.09	8.65	<i>ISG15</i>	1.71	2.19	2.65	66.77
1.01	1.77	1.61	5.518	<i>IRF1</i>	1.1	1.1	1.73	11.17
1.03	1.4	1.8	3.58	<i>IRF3</i>	1.04	1.2	1.41	9.92
0.96	0.37	0.87	1.74	<i>TNFA</i>	1.12	1.41	1.00	0.34
1.01	0.8	0.92	1.19	<i>DAXX</i>	1.1	1.27	2.59	4.91
1.04	0.73	1.18	0.91	<i>IL10</i>	1.14	0.62	1.14	3.36
1.019	0.65	0.87	0.49	<i>THBS1</i>	1.11	1.19	1.06	0.23

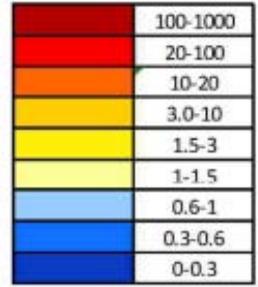


FIG. 7. Comparison of differential expression of 11 genes in host species (rabbit) and nonhost species (ovine) by RT-qPCR. Genes involved in type I IFN signaling pathways are upregulated in both species, while *tnfa* and *il10* are regulated in different manners.

largely different (Fig. 9A). Indeed, 37, 15, and 22 genes were common between the MYXV and the MVA, NYVAC, or ALVAC gene lists. However, few statistically significant GO BP terms were common between these vectors (see Tables S4,

S5, and S6 in the supplemental material). Whereas the genes shared by the MYXV and MVA and NYVAC data sets were essentially related to metabolic functions, MYXV and ALVAC infections induced the upregulation of genes involved in the

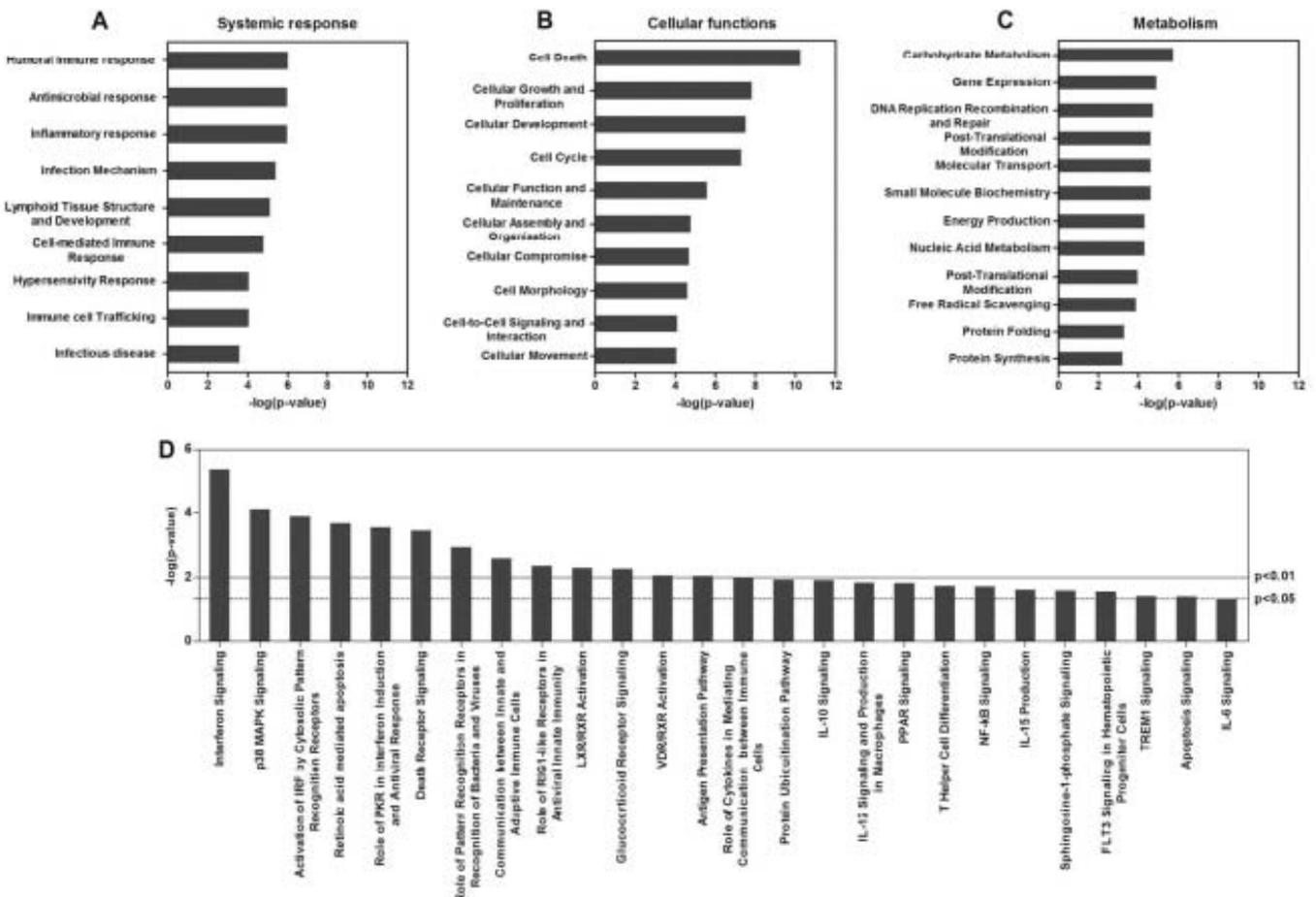


FIG. 8. Gene ontology analysis of the genes that were differentially regulated in response to SG33-GFP. The x axes represent the significance thresholds of given genes involved in a particular function of systemic response (A), cellular function (B), or cell metabolism (C) or in particular pathways (D).

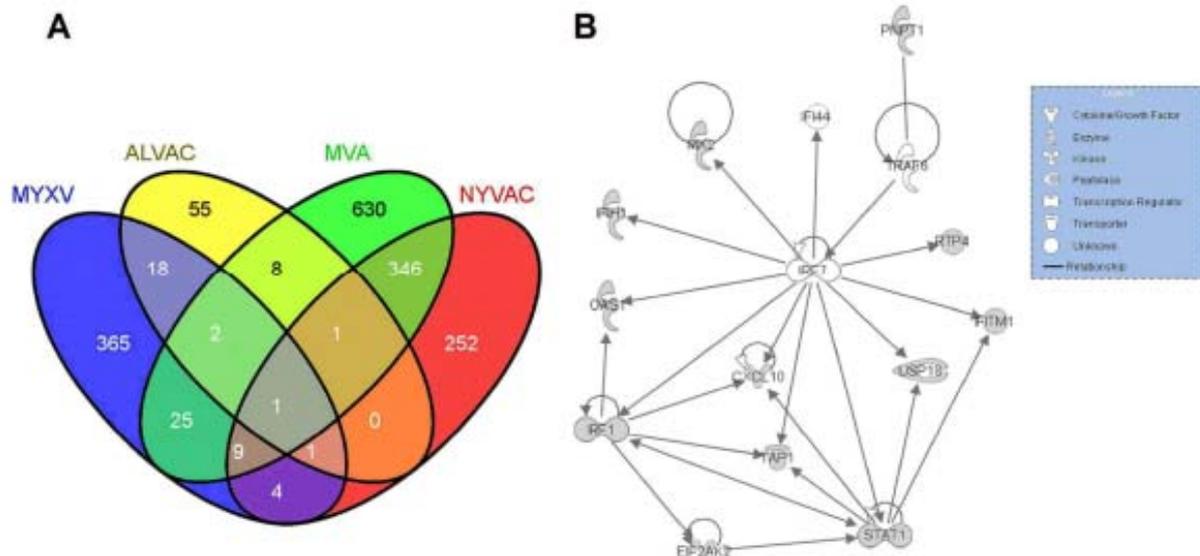


FIG. 9. Venn diagram comparison of genes induced by poxvirus (MYXV, MVA, NYVAC, and ALVAC) infection. (A) Each of the four circles represents a set of genes differentially induced by each virus. Numbers depicted in the intersections between circles represent the numbers of genes that are commonly upregulated in two, three, or four conditions. (B) Pathway analysis of genes common to ALVAC and MYXV.

immune response to viruses, including priming of the CD8<sup>+</sup> T cell response (*eif2ak2*, *ifih1*, *ifitm1*, *isg15*, *irf1*, *mx1*, *mx2*, *stat1*, and *tap1*) and virus-induced cell apoptosis (*eif2ak2*). IRF-7 was central in the network of these genes, as indicated by IPA analysis, and IRF-1-binding sites were statistically overrepresented ( $P = 0.028$ ) within this gene list (Fig. 9B).

## DISCUSSION

In this report, we have investigated the response of ovine DCs to MYXV infection as a model of the interaction between a poxvirus and immune cells from a nonhost species. The capacity to undergo maturation and the expression of genes associated with priming of the adaptive immune response have been evaluated.

We showed for the first time that MYXV has several features related to its capacity to serve as a vaccine vector. First, the viral replication cycle was abortive in ovine DCs, reinforcing the notion of the safety of this platform for use in vaccination of sheep. Furthermore, because the *lacZ* gene driven by a late poxvirus promoter was poorly expressed following MYXV infection of BM-DCs, the recombinant genes should ideally be driven by early promoters. For that reason, the well-known p7.5 promoter is appropriate for vaccine development (45), because it drives GFP expression early after cellular infection and before cell machinery shut-down due to apoptosis.

Second, although the levels of infection achieved at the low MOI are quite high compared to those obtained with other nonreplicative viral vectors, such as adenoviruses (36), MYXV preferentially infects one subtype of DCs. The heterogeneous receptivity of BM-DC subtypes to this virus may be linked to their cell cycle at the time of infection. Langerhans DCs are a main DC population found in the skin (56), and skin DCs were shown to be receptive to infection. Therefore, the intradermal route of vaccine delivery may be the best route of injection to

target cells that are receptive to this vector. The mode of virus entry is not well known for MYXV (19). Recently, Sandgren et al. showed that both forms of VACV enter DCs via macropinocytosis (59). We have previously shown that dextran uptake was more efficient in LC-like DCs, which is a possible explanation for the higher receptivity of these cells to MYXV infection (21).

We have shown that MYXV-infected BM-DCs undergo little maturation based on the upregulation of CD80/86 and CD40 molecules on their cell surface. However, the increased expression of several genes associated with or involved in DC maturation (*il18*, *cd40*, *illrm*, *æb1*, *stat1*, *nfbib*, and *tnf*) indicates that cells are undergoing some maturation due to the infection, which may later be amplified following T cell contact. *thbs1* was the most downregulated gene. Thrombospondin-1 (THBS1) is produced not only by DCs but also by platelets, monocytes, and macrophages (43). Binding of THBS1 to CD47 or CD36 prevents the production of proinflammatory cytokines like interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6, and GM-CSF by maturing DCs without affecting the production of IL-8 and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); this binding also inhibits DC maturation and antigen presentation to T cells (43). Hence, the downregulation of *thbs1* in MYXV-infected DCs should lead to the production of proinflammatory cytokines such as IL-27 or TNF- $\alpha$  that were indeed upregulated in this study. THBS1 is also known to cleave pro-TGF- $\beta$  into the biologically active form of TGF- $\beta$ . Repression of THBS1 expression may also limit the activation of TGF- $\beta$  and preclude the development of associated T helper phenotypes like Th17 or T regulatory cells (34), although the exact role of TGF- $\beta$  in these differentiation processes is still a matter of debate.

It has been well known that some viruses, such as dengue and influenza viruses, are able to induce DC maturation, which can efficiently prime T lymphocytes (4, 7). Conversely, other

viruses, such as cytomegalovirus (CMV), measles, or HIV, have an immunosuppressive effect as a consequence of disruption of the DC functional activity (23). The effect of poxvirus on DC maturation is a matter of controversy.

Drillien et al. have demonstrated that MVA infection induces the maturation of human DCs, as characterized by the upregulation of costimulatory molecules and the secretion of proinflammatory cytokines (18). This result was confirmed by Liu and colleagues (35). Moreover, it has been shown that infection of immature DCs with the recombinant canarypox HIV vaccine vector induced maturation in an indirect way, mediated by TNF- $\alpha$  (40). Of importance, infected DCs were functional and induced IFN- $\gamma$  production by CD8 T cells isolated from HIV-infected individuals (40).

However, it has been reported that VACV-infected mouse BM-DCs do not undergo increases in maturation status (71). As a consequence, the VACV-infected DCs are not capable of activating naive CD8<sup>+</sup> T cells. The finding that VACV infection of DCs generates antigen-presenting cells that are incapable of initiating a T cell response is surprising, since a previous report showed direct antigen presentation and the generation of anti-VACV CD8<sup>+</sup> T cell responses in mice (62). Another study indicated that MVA was not able to induce maturation of human monocyte-derived DCs (MoDCs), but nevertheless, these cells were still able to present viral antigen to specific human cytotoxic T lymphocytes (CTLs) (30), suggesting that maturation of DCs may happen after interaction with T lymphocytes. UV-treated VACV induces stronger costimulatory molecule expression on mouse BM-DCs than VACV itself, suggesting that active mechanisms inhibit the maturation process (71). In addition to the production of suppressive cytokines (e.g., IL-10) that are known to block DC maturation by orf virus (ORFV) (11, 33), the mechanism used by poxviruses to inhibit DC maturation is still poorly understood. VACV also interferes with the maturation of immature human DCs, as indicated by the inhibition of the expression of many proteins known to be induced during the maturation process (20).

Despite the low levels of DC maturation observed in our experiments, examination of the gene profile of infected cells indicates that *nfkB* is significantly upregulated; the activation of NF- $\kappa$ B-dependent pathways leads to maturation (35, 48, 72).

In addition, the upregulation of *ifna* and *tnfa* was also confirmed by RT-qPCR. In a model using human myeloid DCs, a culture of unstimulated DCs was found to contain low levels of IFN- $\alpha$  that are able to enhance the maturation and activation of DCs (29).

In our experiments, when mature BM-DCs were infected with MYXV, they were as susceptible as immature DCs; this possibility may overcome the limits described above. The addition of adjuvant molecules to the viral inoculum in order to promote recruitment and maturation of DCs may help to increase the efficacy of MYXV-vectored immunization, as previously described (12, 55). Further work is under way to evaluate this possibility.

Despite low levels of DC maturation, significant changes were detected in the transcription of proinflammatory cytokines, chemokines, and costimulatory molecules, which indicates that MYXV can stimulate the major functions of DCs necessary for the priming of adaptive immune responses. We

have demonstrated that MYXV infection induces the upregulation of genes involved in the antiviral response by inducing the type I IFN signaling pathway and its associated genes, including *oas1*, *ifit1*, *mx1*, *mx2*, *ifi35*, *stat1*, *tap1*, *irf1*, *irf3*, *EIF4E*, and the interferon-inducible *isg15*. These genes lead to viral degradation and, thus, inhibit viral replication (22, 53). However, IFN production is probably not the mechanism that precludes viral replication in ovine DC cultures, although *isg15* was more highly expressed in ovine cells than in rabbit cells. We have also shown that late gene expression is defective in nonhost species cells. The binding of IFN- $\alpha$  to its receptor stimulates the intracellular IFN signaling cascade and induces an antiviral response by inducing genes involved in OAS1, PKR, and RIG-I-like receptor signaling (63). Of the various MAPK pathways, the p38 signaling cascade has the most important role in the generation of IFN-mediated signals.

Depending on the nature and timing of the maturation stimulus, DCs can preferentially induce different T helper cell responses (16, 32). Our study indicates that infection with MYXV induces the transcription of proinflammatory cytokines, such as *tnfa*, *il6*, *il18*, *il27*, and *cxcl10*, which are involved in the major DC functions, including communication between innate and adaptive immune cells and the polarization of the adaptive immune response to the Th1 phenotype. *cxcl10*, the most upregulated gene in response to MYXV infection in both the microarray analysis and RT-qPCR, is a chemotactic factor for T cells and activated NK cells (13), and its regulation has been suggested to occur via IRF-3 (28). CXCL10 is expressed within tissues following viral infection, suggesting an important role for this chemokine in host defense by contributing to lymphocyte activation, extravasation, and accumulation of virus-specific T cells at the site of infection (58). In our experiments, few cytokines were upregulated, including *il27*, *il12p40*, *il18*, and *il6*. IL-27, an immunomodulatory cytokine, can both promote the early stages of a Th1 response by inducing the proliferation of naive CD4 T cells (50) and limit the Th2 response (1). IL-12p40 and IL-18 both have an effect on Th1 response by inducing the production of IL-2 and IFN- $\gamma$ ; IL-12p40 in turn promotes IL-18 expression (46). IL-6, another upregulated cytokine, is known to stimulate the humoral response by activating B lymphocytes. Altogether, the upregulation of these genes indicates that the response of DC to MYXV infection is notably oriented toward the Th1 pattern of response, which is further confirmed by the efficient induction of inflammatory and antibody responses that was reported by Pignolet et al. (51, 52). Similarly, the other poxviruses, MVA, NYVAC, and ALVAC, induce the transcription of proinflammatory cytokines, such as *tnfa*, *il12*, *cxcl10*, and *il6*.

During the course of infection, transcriptional profiling of MYXV-infected BM-DCs showed that the total RNA amount and RNA quality decrease upon infection, indicating an active process of RNA degradation; this has also been observed in MVA, NYVAC, and ALVAC infection. For VACV and ALVAC infections, this result may be explained by the activation of 5'-oligoadenylate synthetase-like messenger (OAS1) that is responsible for RNA degradation. However, other mechanisms are also present, because this enzyme was found not to be significantly induced in our study, although RNA breakdown was observed. This RNA degradation may be linked to the apoptosis that was clearly seen following infection.

It was clear from our studies that LC-like DCs die rapidly by apoptosis upon MYXV infection. Indeed, apoptosis was more profound in the LC-like DCs than in Mo-like DCs. The development of apoptosis was also confirmed by the gene profiling study, where a group of genes involved in cell death signaling, including *daxx*, *fas*, *casp5*, *casp8*, *irf1*, *tnf*, *il18*, and *cd40*, were upregulated. IL-18 is known to upregulate the FasL-mediated cytotoxicity of murine natural killer cells (67, 68) and to be part of a complex regulatory circuit involved in the causation of apoptotic cell death. The expression of Fas is upregulated by IFN- $\gamma$  (70), which is in turn induced by IL-18. Apoptotic death has also been observed in other pox-DC interactions studied to date. For ALVAC infection, at an MOI of between 0.2 and 1, apoptosis was not induced until 24 h postinfection. Under our conditions, at an MOI of 1, apoptosis was already ongoing only 8 h after infection.

The role of DC apoptosis in the immune response is still unclear, but antigens presented by apoptotic cells are reported to increase immunogenicity and are likely to be more effectively processed for cross-priming (17). Indeed, antigens released from dying cells can be taken up via endocytosis and guided to alternative pathways of antigen presentation. The delayed apoptosis observed in our study may be due to the production of apoptosis inhibitors (64). SERP2 and M11L are both lacking in the SG33-GFP genome. The deletion of the M11L gene in the recombinant SG33-GFP virus was not associated with enhanced apoptosis, although its role in the inhibition of apoptosis in MYXV-infected RL-5 rabbit T cells has previously been described (39). The few DCs that were still alive 16 h after MYXV infection may be sufficient for T cell priming. Indeed, DC migration to the lymph node was evident 6 h after footpad injection in mouse models (47). In the lymph node, resident DCs might take up MYXV-infected apoptotic cells and present epitopes to T cells.

These data indicate that MYXV may be an effective vaccine vector in nonhost species, such as ovines. Comparison of the gene profiles induced by other poxviruses with that induced by MYXV indicated that some regulated genes were common, notably genes belonging to the type I IFN and inflammatory responses. Interestingly, these genes are also present in a list of genes induced by the live attenuated yellow fever vaccine in humans, a vaccine which is probably the most effective vaccine (YF17D) ever developed (44). This observation suggests that some genes involved in the inflammatory and IFN responses may be predictive of protective immune responses and may be used as a benchmark to evaluate and improve the efficacy of novel vaccines.

In conclusion, microarray profiling of a poxvirus-DC interaction helps delineate interesting features of a vector candidate and paves the way for additional improvements to a promising platform.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Moulignié and J. Loupias for technical assistance. This work was funded by the VacGenDC ANR-06-GANI-015 project and by a grant from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) and CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement). E. Foulon was supported by grants from MENRT (Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie). B. Pignolet was supported

by grants from INRA/AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire et Alimentaire). S. Top was supported by grants from INRA/CIRAD.

#### REFERENCES

- Artis, D., et al. 2004. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol.* **173**:5626–5634.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245–252.
- Barcena, J., et al. 2000. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J. Virol.* **74**:1114–1123.
- Bender, A., et al. 1998. The distinctive features of influenza virus infection of dendritic cells. *Immunobiology* **198**:552–567.
- Berenesi, K., et al. 2001. A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *J. Infect. Dis.* **183**:1171–1179.
- Best, S. M., S. V. Collins, and P. J. Kerr. 2000. Coevolution of host and virus: cellular localization of virus in myxoma virus infection of resistant and susceptible European rabbits. *Virology* **277**:76–91.
- Bonini, C., S. P. Lee, S. R. Riddell, and P. D. Greenberg. 2001. Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* **166**:5250–5257.
- Boone, J. D., et al. 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* **25**:672–678.
- Casel, P., F. Moreews, S. Lagarrigue, and C. Klopp. 2009. sigReannot: an oligo-set re-annotation pipeline based on similarities with the Ensembl transcripts and Unigene clusters. *BMC Proc.* **3**(Suppl. 4):S3.
- Chakrabarti, S., K. Brechling, and B. Moss. 1985. Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3403–3409.
- Chan, A., M. Baird, A. A. Mercer, and S. B. Fleming. 2006. Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus-encoded interleukin-10. *J. Gen. Virol.* **87**:3177–3181.
- Chavan, R., K. A. Marfatia, I. C. An, D. A. Garber, and M. B. Feinberg. 2006. Expression of CCL20 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not Flt3-L, from modified vaccinia virus Ankara enhances antiviral cellular and humoral immune responses. *J. Virol.* **80**:7676–7687.
- Chen, J. P., et al. 2006. Dengue virus induces expression of CXCL chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J. Immunol.* **177**:3185–3192.
- Cody, V., et al. 2005. Generation of dendritic cells from rabbit bone marrow mononuclear cell cultures supplemented with hGM-CSF and hIL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **103**:163–172.
- Currier, J. R., et al. 2010. Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. *PLoS One* **5**:e13983.
- de Jong, E. C., et al. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* **168**:1704–1709.
- den Haan, J. M., and M. J. Bevan. 2001. Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:437–441.
- Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau. 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J. Gen. Virol.* **85**:2167–2175.
- Duteyrat, J. L., J. Gelfi, and S. Bertagnoli. 2006. Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch. Virol.* **151**:2161–2180.
- Engelmayer, J., et al. 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* **163**:6762–6768.
- Foulon, E., and G. Foucras. 2008. Two populations of ovine bone marrow-derived dendritic cells can be generated with recombinant GM-CSF and separated on CD11b expression. *J. Immunol. Methods* **339**:1–10.
- Gaucher, D., et al. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J. Exp. Med.* **205**:3119–3131.
- Geijtenbeek, T. B., et al. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587–597.
- Goepfert, P. A., et al. 2011. Phase I safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J. Infect. Dis.* **203**:610–619.
- Gomez, C. E., J. L. Najera, M. Krupa, and M. Esteban. 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* **8**:97–120.
- Guerra, S., et al. 2007. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J. Virol.* **81**:8707–8721.
- Guthrie, A. J., et al. 2009. Protective immunization of horses with a recombinant canarypox virus vectored vaccine co-expressing genes encoding the outer capsid proteins of African horse sickness virus. *Vaccine* **27**:4434–4438.
- Harenberg, A., F. Guillaume, E. J. Ryan, N. Burdin, and F. Spada. 2008. Gene profiling analysis of ALVAC infected human monocyte derived dendritic cells. *Vaccine* **26**:5004–5013.

29. Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau, and Y. J. Liu. 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* **192**:219–226.
30. Kastenmuller, W., et al. 2006. Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. *Virology* **350**:276–288.
31. Keefer, M. C., et al. 2011. A phase I trial of preventive HIV vaccination with heterologous poxviral-vectors containing matching HIV-1 inserts in healthy HIV-uninfected subjects. *Vaccine* **29**:1948–1958.
32. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* **1**:311–316.
33. Lateef, Z., et al. 2003. Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells. *J. Gen. Virol.* **84**:1101–1109.
34. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* **134**:392–404.
35. Liu, L., R. Chavan, and M. B. Feinberg. 2008. Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by modified vaccinia virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. *BMC Immunol.* **9**:15.
36. Liu, M., et al. 2004. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(Suppl. 2):14567–14571.
37. Lohato, Z. L., B. E. Coupar, C. P. Gray, R. Lunt, and M. E. Andrew. 1997. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **59**:293–309.
38. Lynn, D. J., et al. 2008. InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. *Mol. Syst. Biol.* **4**:218.
39. Maceo, J. L., et al. 1996. Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology* **218**:232–237.
40. Marovich, M. A., et al. 2002. Preparation of clinical-grade recombinant canarypox-human immunodeficiency virus vaccine-loaded human dendritic cells. *J. Infect. Dis.* **186**:1242–1252.
41. McCabe, V. J., and N. Spibey. 2005. Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. *Vaccine* **23**:5380–5388.
42. McCabe, V. J., I. Tarpey, and N. Spibey. 2002. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine* **20**:2454–2462.
43. Mittal, R., I. Gonzalez-Gomez, and N. V. Prasadarao. 2010. Escherichia coli K1 promotes the ligation of CD47 with thrombospondin-1 to prevent the maturation of dendritic cells in the pathogenesis of neonatal meningitis. *J. Immunol.* **185**:2998–3006.
44. Monath, T. P. 2005. Yellow fever vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **4**:553–574.
45. Moss, B. 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:11341–11348.
46. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui, and H. Okamura. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:423–474.
47. Norbury, C. C., D. Mallide, J. S. Gibbs, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2002. Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:265–271.
48. Oie, K. L., and D. J. Pickup. 2001. Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-kappaB activation. *Virology* **288**:175–187.
49. Perrin, A., et al. 2007. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* **25**:6774–6783.
50. Pflanz, S., et al. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **16**:779–790.
51. Pignolet, B., et al. 2008. Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants. *J. Gen. Virol.* **89**:1371–1379.
52. Pignolet, B., et al. 2007. In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains. *Virol. J.* **4**:94.
53. Platanias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:375–386.
54. Querec, T. D., et al. 2009. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* **10**:116–125.
55. Reali, E., D. Canter, H. Zeytin, J. Schlom, and J. W. Greiner. 2005. Comparative studies of avipox-GM-CSF versus recombinant GM-CSF protein as immune adjuvants with different vaccine platforms. *Vaccine* **23**:2909–2921.
56. Romani, N., B. E. Clausen, and P. Stoitzner. 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* **234**:120–141.
57. Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**:365–386.
58. Ryan, E. J., A. Harenberg, and N. Burdin. 2007. The Canarypox-virus vaccine vector ALVAC triggers the release of IFN-gamma by natural killer (NK) cells enhancing Th1 polarization. *Vaccine* **25**:3380–3390.
59. Sandgren, K. J., et al. 2010. A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathog.* **6**:e1000866.
60. Saurat, P., Y. Gilbert, and J. P. Ganiere. 1978. Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev. Med. Vet.* **129**:415–451.
61. Seet, B. T., et al. 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:377–423.
62. Shen, X., S. B. Wong, C. B. Buck, J. Zhang, and R. F. Siliciano. 2002. Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. *J. Immunol.* **169**:4222–4229.
63. Siren, J., et al. 2006. Retinoic acid inducible gene-1 and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect.* **8**:2013–2020.
64. Stanford, M. M., S. J. Werden, and G. McFadden. 2007. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet. Res.* **38**:299–318.
65. Stoitzner, P., N. Romani, A. D. McLellan, C. H. Tripp, and S. Ebner. 2010. Isolation of skin dendritic cells from mouse and man. *Methods Mol. Biol.* **598**:235–248.
66. Sung, H., and M. R. Schleiss. 2010. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **9**:1303–1314.
67. Tao, Q., G. Srivastava, P. Dickens, and F. C. Ho. 1996. Detection of Epstein-Barr virus-infected mucosal lymphocytes in nasal polyps. *Am. J. Pathol.* **149**:1111–1118.
68. Tsutsui, H., et al. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* **157**:3967–3973.
69. Vandesompele, J., et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**:RESEARCH0034.
70. Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**:314–317.
71. Yates, N. L., and M. A. Alexander-Miller. 2007. Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. *Virology* **359**:349–361.
72. Yoshimura, S., J. Bondeson, B. M. Foxwell, F. M. Brennan, and M. Feldmann. 2001. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* **13**:675–683.

## C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser la souche atténuée SG33 du MYXV, pour une question de sécurité d'emploi. En effet, cette souche doit son atténuation à la perte de 15 kb dans son génome (285). Cette délétion est située au niveau des RIT avec notamment la disparition de 3 gènes (*Serp2*, *Serp3* et *MV-LAP*) codant pour des facteurs de pathogénicité (48), rendant ainsi la pathogénicité résiduelle du virus dans l'espèce cible très faible. Cette sécurité d'emploi, nous l'avons aussi mise en évidence dans le cadre de la vaccination chez les ruminants puisque dans un premier temps nous avons montré que le MYXV était capable d'infecter les DC ovines mais que le cycle de réplication était abortif.

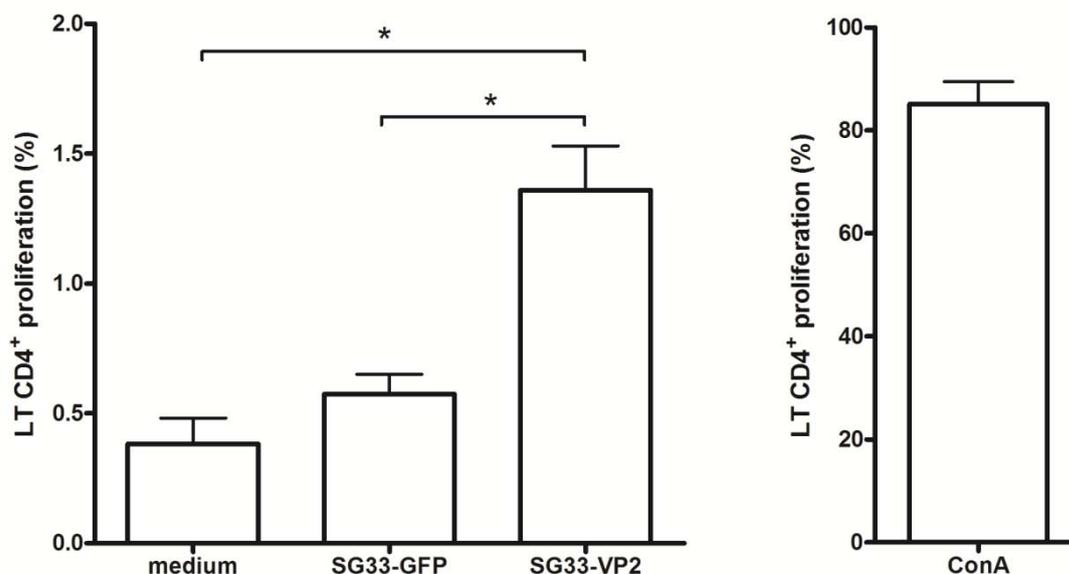
En effet, nous avons montré que l'expression du gène *LacZ* sous le contrôle d'un promoteur tardif, survient à une fréquence moindre dans les DC ovines, ce qui pourrait considérablement compromettre la formation de particules virales, conduisant par conséquent à un cycle de réplication viral incomplet.

Parmi les DC présentes dans la culture, des DC de type Langerhans sont préférentiellement infectées et il en est de même pour les cellules dendritiques issues de la peau. Cela suggère l'utilisation de la voie d'inoculation intradermique lors de l'inoculation des vaccins MYXV, puisque les cellules dendritiques de type Langerhans sont les DC majoritairement présentes au niveau de la peau. Toutefois, la voie intradermique n'est pas une voie d'inoculation classique et facilement utilisable chez les ruminants, pour des raisons de sécurité et de praticabilité.

Par ailleurs, nous avons montré via la régulation des marqueurs CD80/86 et CD40, que le MYXV induit très peu la maturation des DC. Leur infection par le MYXV est par ailleurs, possible quel que soit leur état de maturation. L'étude du profil d'expression génique des DC suite à l'infection par le MYXV a montré une surexpression de plusieurs gènes (*il18*, *cd40*, *il1rm*, *creb1*, *stat1*, *nfkb1b* et *tnf*) impliqués dans la maturation cellulaire. Ce phénomène pourrait être amplifié suite au contact avec les lymphocytes T. Cela est aussi confirmé par la

forte répression du gène *thsb1*, dont la présence est connue pour inhiber la maturation des cellules et la présentation des antigènes aux LT et par la surexpression d'*ifna* et *ifnb*, qui eux, sont connus pour induire la maturation et l'activation des DC. Cependant il est à noter que l'effet des poxvirus sur la maturation des DC est sujet à controverse. Certains auteurs ont montré que l'infection par un poxvirus induisait la maturation des DC (83, 195), permettant l'activation des LT. A l'inverse, d'autres auteurs ont observé une absence de maturation des DC suite à une infection par un poxvirus, que les DC aient ou non la capacité de présenter les antigènes au LT (178, 286, 298, 358). Cela suggère que la maturation pourrait s'effectuer après l'interaction avec les LT. Dans notre cas, malgré la faible maturation des DC observée, nous avons montré par une étude préliminaire *in vitro*, que les DC infectées par le SG33 exprimant la protéine VP2 du BTV-8 sont capables de présenter l'antigène aux LT CD4 et de promouvoir une réponse immune spécifique de l'antigène (**Figure 16**).

Ces résultats sont confirmés par l'étude transcriptomique des DC, dans laquelle on a observé que l'infection par le MYXV induit la transcription de gènes et de cytokines pro-inflammatoires impliqués dans les fonctions majeures des DC, comme la mise en place d'une réponse antivirale. Les principales fonctions identifiées concernent la dégradation du virus et l'inhibition de la réplication virale via l'induction de la voie de signalisation de l'IFN de type I (*oas1*, *ifitm1*, *mx1*, *mx2*, *ifi35*, *stat1*, *tap1*, *irf1*, *irf3*, *EIF4E* et *isg15*), la communication entre les cellules de l'immunité innée et adaptative, et la polarisation de la réponse immune adaptative vers une réponse de type Th1 (*tnfa*, *il6*, *il12p40*, *il18*, *il27*, et *cxcl10*). Il en est de même pour d'autres virus comme le MVA, NYVAC, et ALVAC qui induisent eux aussi la transcription de cytokines proinflammatoires comme *tnfa*, *il12*, *cxcl10* et *il6*.



**Figure 16.** Les BM-DC infectées par le SG33 sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> et d'induire leur prolifération. Trois moutons ont été vaccinés avec un vaccin inactivé BTV-8 (BTV-8 AIsap PUR, Merial Limited SAS, Lyon, France). Les cellules provenant des ganglions lymphatiques drainant de chaque animal ont été isolées et marquées au CFSE. Les Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été séparés avec des anticorps anti-CD4-PE (Serotec) et des IgG anti-souris couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec) sur les colonnes MS selon les recommandations du fabricant. Les BM-DC ont été générées *in vitro* à partir du sternum de chaque animal et stimulées pendant quatre heures avec du milieu, de la concanavaline A (ConA), du virus semi-purifié SG33-GFP ou SG33-VP2 (VP2 étant une protéine structurale de BTV-8) (MOI de 1). Puis les LT CD4<sup>+</sup> marqués au CFSE ont été mis en contact avec les BM-DC stimulées (ratio 1:10 DC:CD4) et mis en culture pendant 4 jours. La prolifération a été déterminée en mesurant la dilution du marquage CFSE des LT CD4<sup>+</sup> par cytométrie en flux sur au moins 5000 événements. La stimulation des BM-DC avec le virus SG33-VP2 induit une prolifération des LT CD4<sup>+</sup> qui est significativement plus élevée que celle induite par la stimulation avec le SG33-GFP ou juste avec du milieu (ANOVA, *p-values* <0.05 est indiqué (\*)). Ces résultats mettent en évidence la capacité des BM-DC infectées avec le recombinant MYXV à stimuler une réponse LT CD4<sup>+</sup>.

Au cours de l'infection par le MYXV, il a été observé que la quantité et la qualité des ARN totaux des DC diminuaient, suggérant la mise en place d'un processus de dégradation de l'ARN. Le même phénomène a été observé lors d'infection avec le MVA, NYVAC et ALVAC. Pour le VACV, l'enzyme OASL serait responsable de cette dégradation. Dans notre étude, cette enzyme n'a pas été détectée suggérant un autre mécanisme de dégradation comme l'apoptose. En effet, nous avons clairement démontré que les DC mourraient rapidement par apoptose durant l'infection par le MYXV et que cela touchait plus particulièrement les DC de type Langherans. Ces résultats ont été confirmés par l'étude du profil d'expression génique des DC notamment avec la surexpression des gènes impliqués dans la voie de signalisation de la mort cellulaire (*daxx, fas, casp5, casp8, ifr1, tnf, il18* et *cd40*).

Le rôle de l'apoptose dans la réponse immunitaire est encore mal connu, mais la capacité des DC non infectées à phagocyter et à présenter par cross-présentation à leurs surfaces des antigènes viraux libérés après la mort par apoptose des cellules infectées, a été démontré *in vitro* (79). De plus nous avons observé qu'une fraction des DC était encore vivantes 16 heures après infection, laissant penser que les cellules infectées pourraient avoir le temps de migrer jusqu'au nœud lymphatique drainant. Une fois arrivées dans les nœuds lymphatiques, les cellules infectées pourraient mourir par apoptose, aboutissant à la formation de corps apoptotiques qui seront à leur tour, pris en charge par les DC résidentes. Ces dernières pourraient alors présenter les épitopes du produit du transgène d'intérêt au LT, entraînant ainsi leur activation et la mise en place de la réponse adaptative.

La comparaison du profil d'expression génique induit par les autres poxvirus avec celui induit par le MYXV indique que certains gènes régulés sont communs, comme ceux impliqués dans la réponse IFN de type I et inflammatoire. Ces gènes sont, de façon intéressante, présents dans la liste de gènes induits sur les cellules totales du sang, par un vaccin atténué très efficace dirigé contre le virus de la fièvre jaune (YF17D). Les gènes impliqués dans la réponse

inflammatoire et la réponse IFN pourraient être prédictif d'une réponse immune protective et être potentiellement utilisés dans des modèles d'évaluation de l'efficacité de nouveaux candidats vaccins.

## II. MYXV, application à la vaccination contre la fièvre catarrhale ovine

Nous avons précédemment montré que le MYXV était sûr d'emploi, non réplicatif chez les ruminants et immunogène puisqu'il est capable d'induire une réponse humorale efficace contre une protéine recombinante (252, 264, 265). De plus l'étude des interactions MYXV/DC a montré que ce virus est capable d'exprimer un transgène, pouvant être présenté de façon efficace par les DC au LT, entraînant ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique du transgène. Ces données ont été confirmées par l'analyse transcriptomique des DC, avec la surexpression de gènes impliqués dans la réponse IFN de type I mais aussi dans la réponse inflammatoire. Ces résultats suggèrent la mise en place d'une réponse immune adaptative efficace, de phénotype plutôt Th1, et qui est similaire à celles induite par le YF17D, un des vaccins les plus efficaces chez l'homme (331).

Toutes ces données confortent l'idée que le vecteur MYXV pourrait être un vecteur vaccinal prometteur chez les ruminants. Dans ce but, nous avons évalué le pouvoir protecteur du MYXV en tant que vecteur vaccinal dans le cadre de la vaccination contre la bluetongue. Le choix de cette maladie reposait sur des données scientifiques (*cf infra*) mais aussi sur l'actualité en matière d'émergence virale. Lorsque notre projet a débuté, l'Union Européenne connaissait en effet de graves épizooties de FCO. Le sérotype 8 était apparu en 2006 en Europe du nord, puis avait envahi les 2/3 du territoire français en une année. L'impact économique de la maladie sur les cheptels ovins et bovins était donc très important et le moyen de lutte le plus efficace reposait sur la vaccination. Ainsi développer un vaccin alliant à la fois innocuité et efficacité vis-à-vis de la FCO était un objectif majeur en santé animale. Deux études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité vaccinale de MYXV recombinants, exprimant les protéines VP2 et/ou VP5 pour la première étude et VP7 pour la seconde.

## **A. Evaluation du pouvoir protecteur des recombinants SG33 exprimant les protéines structurales VP2 et VP5**

### **1. Introduction**

Compte tenu de l'actualité épidémiologique, nous nous sommes intéressés à la vaccination contre le sérotype 8 du BTV. Le choix des gènes à exprimer s'est porté dans un premier temps sur les protéines VP2 et VP5. La protéine VP2 porte à la fois des épitopes majeurs responsables de la réponse neutralisante protectrice et des déterminants immunogènes majeurs des CTL et des LT helper. De plus, il a été montré que la présence de VP5 semblait augmenter la réponse en anticorps neutralisants, induite par la protéine VP2 (197, 266, 278). Nous avons donc construit des MYXV SG33 recombinés exprimant la protéine de la capsid externe VP2 (SG33-VP2) seule ou en association avec la protéine de la capsid externe VP5 (SG33-VP2/5) de sérotype 8 du BTV et nous avons évalué la réponse immune et le pouvoir protecteur induit par ces recombinants chez des moutons vis-à-vis d'une inoculation d'épreuve avec un isolat hyper-virulent du BTV-8.

### **2. Article II**

***Myxomavirus as a vector for immunisation of sheep protection study against challenge with bluetongue virus.***

Sokunthea Top<sup>a</sup>, Gilles Foucras<sup>a,b</sup>, Martine Deplanche<sup>a</sup>, Germain Rives<sup>b</sup>, Jérôme Calvalido<sup>b</sup>, Philippe Pourquier<sup>c</sup>, Stephane Bertagnoli<sup>a,b</sup>, Gilles Meyer<sup>a,b,\*</sup>

Accepté pour publication dans *Vaccine*



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)



## Myxomavirus as a vector for the immunisation of sheep: Protection study against challenge with bluetongue virus

Sokunthea Top<sup>a</sup>, Gilles Foucras<sup>b,a</sup>, Martine Deplanche<sup>a</sup>, Germain Rives<sup>b</sup>, Jérôme Calvalido<sup>b</sup>,  
Loïc Comtet<sup>c</sup>, Stéphane Bertagnoli<sup>b,a</sup>, Gilles Meyer<sup>b,a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

<sup>c</sup> ID VET, 167 rue Mehdi Ben Barka - Zone Garosud, F-34070 Montpellier, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 October 2011

Received in revised form

15 December 2011

Accepted 22 December 2011

Available online xxx

#### Keywords:

Myxomavirus

Sheep

Immunisation

Bluetongue

### ABSTRACT

Recombinant poxviruses are well suited for the development of new vaccine vectors. Our previous data supported the idea that *Myxomavirus* (MYXV) is efficient at priming antibody responses in sheep. To provide definitive evidence on the potential of MYXV for vaccination against infectious diseases in ruminants, we investigated the immune protection provided by recombinant MYXV against bluetongue, a devastating disease in sheep. To test this concept, sheep were injected twice with an MYXV expressing the immunodominant VP2 protein (SG33-VP2). The SG33-VP2 vector promoted the production of neutralising antibodies and partially protected sheep against disease after challenge with a highly virulent strain of serotype-8 bluetongue virus (BTV-8). In contrast, an MYXV expressing both VP2 and VP5 proteins (SG33-VP2/5) elicited very little protection. The expression levels of the VP2 and VP5 proteins suggested that, greater than the co-expression of the VP5 protein which was previously thought to favour anti-VP2 antibody response, the high expression of VP2 may be critical in the MYXV context to stimulate a protective response in sheep. This highlights the requirement for a careful examination of antigen expression before any conclusion can be drawn on the respective role of the protective antigens. As a proof of principle, our study shows that an MYXV vaccine vector is possible in ruminants.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The development of new vaccines using recombinant poxviruses has been well documented [1,2] as these viruses combine both safety and strong immunogenicity [3]. Several poxvirus vectors are currently under evaluation for vaccine development against infectious diseases [4–8]. Vaccinia virus (VACV) has been the most extensively studied poxvirus vector; however, concern over broad host-range specificity and risks to immuno-compromised persons has led to the search for alternative poxviruses. In ruminants, both replicative capripoxvirus and non-replicative modified vaccine Ankara (MVA) or avipoxvirus vectors have been used with some success for immunisation against livestock diseases [9,10]. One advantage of these vectors is that they make it possible to distinguish naturally infected animals from vaccinated animals (DIVA strategy) in control programmes.

During the last few years, we investigated the potential of *Myxomavirus* (MYXV) to be used as a non-replicative vector for ruminant immunisation. We have previously shown that MYXV can abortively infect several ruminant cell types, such as peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [11] and bone marrow-derived dendritic cells (BoM-DCs) [12], and that it permits recombinant antigen expression. Gene expression arrays of MYXV-infected ovine BoM-DCs indicated a strong up-regulation of type I IFN-related genes and expression of a set of genes regulated by IRF7 that were previously shown to be predictive for vaccine efficacy [12]. In parallel, *in vivo* studies showed that MYXV is safe in sheep and that it can induce a humoral immune response against a recombinant protein with biological relevance [11,13]. Collectively, these data support the idea that MYXV should be considered a promising vector amongst poxviruses.

To provide definitive evidence on the potential of MYXV for vaccination in ruminants, in this study, we investigated the capacity of the MYXV SG33 vaccine strain to provide immune protection against a major infectious disease in sheep. To this end, we used a challenge with a highly virulent bluetongue serotype 8 (BTV-8) isolate. Several poxvirus-based recombinant vaccines have previously been tested in a BTV challenge [10,14,15]. These studies used

\* Corresponding author at: Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France. Tel.: +33 561 193 298; fax: +33 561 193 834.  
E-mail address: [g.meyer@envt.fr](mailto:g.meyer@envt.fr) (G. Meyer).

poxviruses that expressed at least the highly variable VP2 protein, which has been shown to be the basis of the neutralising activity [16,17], a major CTL immunogen [18–20], and a determinant of the lymphocyte T helper response [21]. Moreover, co-expression of VP2 and VP5 was suggested to enhance the neutralising antibody response against BTV [22]. Therefore, we engineered two MYXV vectors, one that expressed VP2 alone and one that expressed a combination of the VP2 and VP5 proteins of BTV-8, and evaluated the immune response and protection provided by these recombinant vectors after homologous challenge with a highly virulent BTV-8 strain.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Construction of recombinant MYXV expressing BTV proteins

Recombinants were obtained by homologous recombination of the M009L and M012L genes of the SG33 MYXV strain [23] and pAT-GPT donor plasmids containing the EcoGpt selection cassette [13] (supplementary data 1). The recombinant SG33-VP2, SG33-VP5 and SG33-VP2/5 contained the synthetic BTV-8 L2 and/or M5 genes under the control of the vaccinia virus early-late H6 [24] and the entomopoxvirus early 42k [25] promoters, respectively (supplementary data 2). The SG33-del recombinant contained the EcoGpt selection cassette without the BTV genes. Recombinant viruses were selected by resistance to mycophenolic acid [26], sequentially purified from parental viruses and confirmed for absence of mutations or abnormalities (supplementary data 3).

### 2.2. Quantification of transcripts by RT-qPCR

The VP2 and VP5 RNA transcripts were quantified by RT-qPCR in triplicate. After total RNA isolation (Nucleospin RNA II; Macherey-Nagel) and DNaseI treatment, reverse transcription was performed with superscript II Reverse Transcriptase. qPCR was performed on cDNA using primer sets specific for L2, M5, M071L or GAPDH housekeeping genes (supplementary data 4) on a 5700 sequence detection system (Applied biosystems). A standard plasmid curve was obtained by serial dilutions of plasmid pAT-VP2, pAT-VP5, pVP2-M071L and pGAPDH.

### 2.3. Protein expression

Rabbit kidney cells (RK13, ATCC CCL-37) were infected with recombinant viruses at an m.o.i. of 1 [13] and were then fixed at 24 h pi with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS and permeabilised with 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS. Staining was performed using a rabbit polyclonal anti-MYXV hyperimmune serum (1/500), anti-VP2 (1/1000; ID VET, Montpellier, France) or anti-VP5 (1/100; Ingenasa, Madrid, Spain) mouse monoclonal antibodies. FITC-coupled swine anti-rabbit IgG (1/200; Dako) and rhodamine RX-coupled anti-mouse IgG (1/200; Jackson ImmunoResearch) were used for secondary staining. Nuclear staining was achieved using Topro-3 iodide (Invitrogen). The multistaining experiments were performed using the sequential mode (confocal LSM Olympus microscope).

The level of protein expression was measured by flow cytometry. RK13 cells were infected, fixed and permeabilised as described above. Cells were stained for MYXV or VP2 as described above, except that RPE-coupled goat anti-mouse IgG (1/200, BD Biosciences) was used for secondary staining. Acquisition was performed on 20,000 events using a FACScalibur cytometer (BD Biosciences) and the data were analysed with FlowJo software.

### 2.4. Design of the experimental challenge

Experimentation was conducted as prescribed by the guidelines of the UE Council on Animal Care (86/609/CEE) and approved by the ethical committee of the Veterinary College. Twenty-four healthy Lacaune male lambs were purchased from a BTV-free farm that did not practice vaccination against BT. They were housed in biosafety level 3 units and periodically tested for the absence of BTV infection by RT-qPCR (Taqvet Lsi, France), ELISA (Id-screen VP7, ID VET, France) and seroneutralisation. Three groups of five sheep were immunised twice, at day 0 (D0) and D24, subcutaneously with  $6 \times 10^8$  PFU/animal of either SG33-del, SG33-VP2 or SG33-VP2/5. The fourth group (Inac-BTV8) of five sheep was used as a gold standard: sheep were immunised once at D17 with a BTV-8 inactivated vaccine (BTVpur Alsap 8, lot number L25-4569, conserved at 4 °C, Merial SAS, Lyon, France) by subcutaneous injection (20 G needle) in the neck according to the manufacturer's recommendations. The last control group of four sheep was not immunised.

All of the sheep, except for those in the control group, were challenged at D45 by intravenous (2 mL) and subcutaneous (10 mL) injections of a highly virulent BTV-8 blood inoculum ( $8.1 \times 10^6$  dsRNA copies/mL of blood). The inoculum was prepared by 5 passages of BTV-8 W1B1 (kindly provided by Dr E. Breard, ANSES-LERPAZ, Maison-Alfort, France) in baby hamster kidney cells (BHK-21, ATCC-CCL10) and then by two successive amplifications in sheep, as previously described [12,27]. All animals were euthanised through anaesthesia overdose (5 mg/kg ketamine followed by 15 mg/kg pentobarbital sodium) for ethical reasons during experimentation or at the end of the experiment (D66).

Clinical examinations were conducted daily, by the same investigator, beginning three days before challenge (D42) and continuing to the end of the experiment. A clinical score was calculated as previously described [15], except that clinical signs were expressed for each day post challenge.

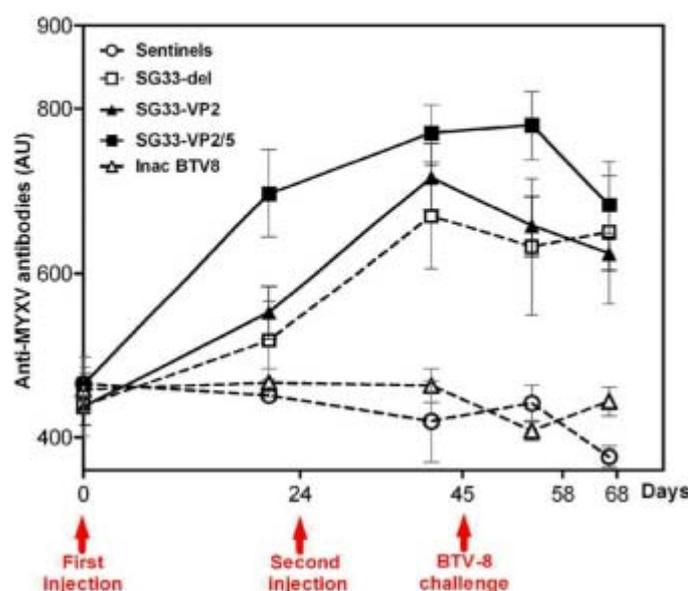
### 2.5. Viral RNA quantification

EDTA whole blood was collected at D42, D45 of challenge and every two days post challenge until euthanasia. RNA extraction from 100  $\mu$ l of blood was carried out using the Nucleospin RNA virus kit (Macherey-Nagel). BTV detection was performed by RT-qPCR on the L1 BTV gene using one-step protocol (Taqvet all genotypes, LSI). A standard plasmid curve for quantification was determined using dilutions of the pBTVM plasmid containing the L1 gene replicon.

### 2.6. Evaluation of the immune response

Sera were collected at D0, D24, D45 (challenge), D48, D51, D54, D58 and D68 for the evaluation of the antibody response against MYXV and BTV. MYXV ELISA was performed as previously described [15]. Serum neutralising antibodies were titrated in Vero cells (ATCC CCL-81) using the BTV-8 W1B1 virus, as previously described [27]. The detection of VP7-specific IgG was carried out using a competitive ELISA (ID Screen<sup>®</sup> Bluetongue Competition ELISA kit, ID VET, Montpellier, France). For IgM, 96-well plates were coated with anti-IgM antibodies. Sera (1/10 dilution) were then added for 3 h at 37 °C. After washing, peroxidase-coupled VP7 protein was added for 1 h at room temperature. Twenty minutes after the addition of the substrate solution (tetramethylbenzidine at 2.4 mg/mL) (Sigma, France), the reaction was stopped with sulphuric acid (1 N). The detection of anti-VP7 IgM was expressed as the optical density (OD), measured at 450 nm.

The T helper response was assessed using a carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labelling assay [28]. Briefly, PBMCs were isolated at D65. After staining with CFSE (Invitrogen,



**Fig. 1.** The MYXV antibody response. Mean titres of antibodies against MYXV in the SG33-del, SG33-VP2, SG33-VP2/5 and Inac-BTV-8 groups were determined using MYXV ELISA. None of the sheep in the SG33-VP5 group were tested because VP5 alone was previously shown not to be sufficient for protection against bluetongue [16,28]. The results are expressed as arbitrary units.

Cergy-Pontoise, France), cells were seeded into 24-well plates at a density of  $4 \times 10^6$  cells/well in the presence of either medium only or recombinant virus SG33-del or SG33-VP2 at an m.o.i. of 1. After four days, the cells were labelled with PE- anti-CD4 and A647-anti-CD2 antibodies (Abd Serotec, Düsseldorf, Germany), and viability was determined using propidium iodide (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France) at  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Acquisition was performed using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson), and the data were analysed with Flowjo software.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graphpad software (La Jolla, USA). A two-way ANOVA without repeated measures was used for comparison of the clinical, virological and seroneutralisation results. When the effects of the 'day' and 'treatment' factors were significant amongst interactions, a Bonferroni test amongst contrasts was used to compare the treatments on each day. A one-way ANOVA without repeated measures was used for comparison of the flow cytometry results. When the effect of the "treatment" factor was significant, a Newman-Keuls test was used to compare the treatment effects on each time point.

## 3. Results

### 3.1. Assessment of the immune response induced by recombinant MYXV

Recombinant expression of VP2 and VP5 proteins was confirmed by immunofluorescence in RK13 cells. After being injected into sheep, all recombinant SG33 MYXV viruses induced an antibody response against MYXV (Fig. 1). At D24 (second injection), only the SG33-VP2/5 group showed a seroconversion against MYXV (AU >600), with significant differences ( $p \leq 0.05$ ) when compared to the control group. Twenty-one days after the second injection (D45), the antibody response against MYXV was highly comparable amongst the MYXV-injected groups (Fig. 1), whereas no antibody

response against MYXV was detected in the control and Inac-BTV8 groups.

The BTV-specific antibody response was assessed by seroneutralisation. Just before challenge (D45), neutralising antibodies against BTV-8 were detected in all sheep in the Inac-BTV8 group and in three out of five sheep in the SG33-VP2 group, with titres ranging from 68 to  $180 \text{ED}_{50}/\text{mL}$  and 40 to  $120 \text{ED}_{50}/\text{mL}$ , respectively (Table 1). Surprisingly, no neutralising antibody response was detected in sheep immunised with SG33-VP2/5 at the same date.

### 3.2. Protection studies in sheep after BTV-8 challenge

#### 3.2.1. Clinical protection

The BTV-8 challenge was efficient, as all of the sheep in the SG33-del group became febrile four days post-challenge and developed moderate to severe disease by D51 to D65. Clinical signs included fever, prostration, nasal discharge, conjunctivitis, facial oedema and congestion, haemorrhaging and ulceration of the oral cavity. For three animals, increasing respiratory distress and rapid loss of body weight were observed. Two lambs were euthanised for ethical reasons at D56 and D60 because of prostration and coma. In contrast, sheep in the Inac-BTV-8 group remained healthy during the course of the experiment, as did three out of five sheep immunised with SG33-VP2. The two other SG33-VP2-immunised sheep developed only mild congestion of the head for three days and then recovered rapidly. The clinical findings were much more diverse for the SG33-VP2/5 group. One animal did not show any clinical signs, another developed severe disease and the remaining three showed moderate symptoms for three to five days post-challenge.

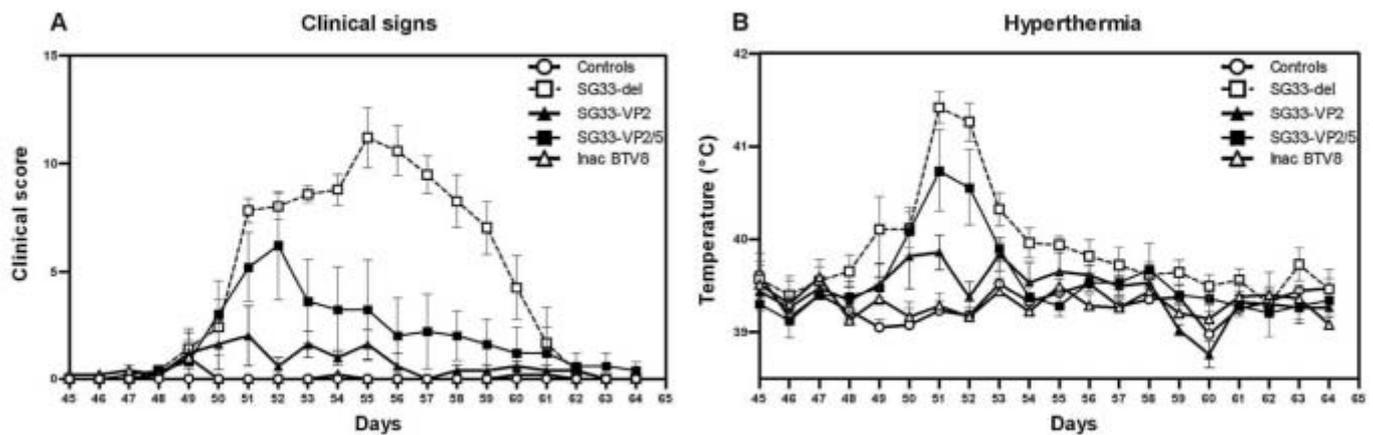
The peaks of the mean clinical score were 11.2 (D55), 6.7 (D53), 2 (D51) and 1.3 (D49) for the SG33-del, SG33-VP2/5, SG33-VP2 and Inac-BTV8 groups, respectively (Fig. 2A). Significant differences ( $p < 0.01$ ) were observed between the SG33-del group and the SG33-VP2 or Inac-BTV8 groups from D51 to D60 and between the SG33-del and SG33-VP2/5 groups from D53 to D59. No significant differences were observed between the SG33-VP2 and Inac-BTV-8 groups.

The mean rectal temperatures are shown in Fig. 2B. Hyperthermia ( $>40.5^\circ\text{C}$ ) was detected in all animals of the SG33-del group from D49 to D53. Only moderate hyperthermia (between  $40$  and  $40.5^\circ\text{C}$ ) was observed for one to two days in three sheep of the SG33-VP2 group and two sheep of the Inac-BTV8 group. In the SG33-VP2/5 group, two sheep developed hyperthermia  $>40.5^\circ\text{C}$  for 3 days, two others presented hyperthermia between  $40^\circ\text{C}$  and  $40.5^\circ\text{C}$  for four days, and one sheep remained under  $40^\circ\text{C}$ . The mean peaks of temperature were  $39.4^\circ\text{C}$  (D47),  $39.9^\circ\text{C}$  (D51),  $40.7^\circ\text{C}$  (D53) and  $41.4^\circ\text{C}$  (D53) for the Inac-BTV8, SG33-VP2, SG33-VP2/5 and SG33-del groups, respectively.

#### 3.2.2. Virological protection

BTV-8 mRNA copies were detected in large quantities, between  $4.8$  and  $7 \log_{10}$  RNA copies/mL of blood, from D49 to the end of the experiment in all sheep of the SG33-del and SG33-VP2/5 groups (Fig. 3). In contrast, very low numbers of BTV-8 RNA copies ( $<1.3 \log_{10}$  RNA copies/mL) were detected in only two sheep of the Inac-BTV8 group between D49 and D59. The average BTV RNA load of the SG33-VP2 group was between  $2.2$  and  $4.2 \log_{10}$  of RNA copies/mL lower than in the SG33-del group. Two SG33-VP2 sheep expressed very low quantities of BTV RNA copies ( $\leq 3.9 \log_{10}$  copies/mL) at D59, one sheep expressed quantities lower than  $4.9 \log_{10}$  copies/mL for six days, and the remaining two SG33-VP2 animals were positive from D47 to D60, with RNA copy amounts varying between  $4.1 \log_{10}/\text{mL}$  and  $7.2 \log_{10}/\text{mL}$  of blood.

No significant differences were observed between the SG33-del and SG33VP2/5 groups. Significant differences ( $p < 0.01$ ) were observed between the SG33-del and SG33-VP2 (D51 to D55)



**Fig. 2.** Clinical examination. (A) Mean clinical scores of unvaccinated sheep (control group) and SG33-del, SG33-VP2, SG33-VP2/5 or inactivated BTv-8 vaccinated sheep, after challenge (D45) with BTv-8. Clinical signs were scored for the five groups during 20 days from D45 to D65. (B) Mean rectal temperature of the five groups during the course of the challenge (D45 to D65). NB: Immunisation of sheep with SG33-del was previously shown to have no effect on clinical signs and viraemia observed after BTv-8 challenge (Meyer, non published data).

or Inac-BTV8 (D45 to D65) groups. The difference between the SG33-VP2 and Inac-BTV8 groups from D47 to D53 was significant ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Immune response after challenge

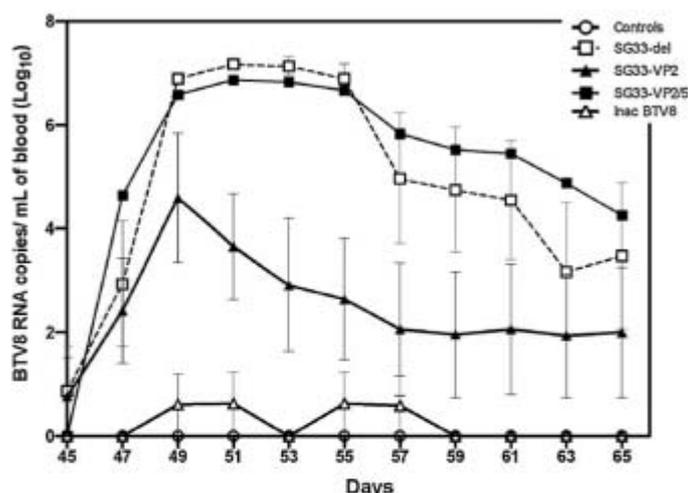
For the five Inac-BTV8 sheep and the three SG33-VP2 sheep that possessed BTv-8 neutralising antibodies just before challenge, a rise in the antibody response was observed from D51 (Table 1). The two other SG33-VP2 sheep developed a neutralising antibody response starting at D51, three days before the animals of the SG33-del group. In the SG33-del and SG33-VP2/5 groups, neutralising antibodies were detected at the same time (D54) but the titres were

higher in the SG33-VP2/5 group. Finally, high antibody titres found at D65 indicated that the BTv-8 challenge induced a high neutralising immune response in all naïve sheep and a strong and more rapid seroconversion in the VP2 or VP2/5-immunised sheep.

The IgM response against VP7 protein was detected at D51 in the Inac-BTV8 group and D53 in the SG33-VP2, SG33-VP2/5 and SG33-del groups (Fig. 4B). Titres of anti-VP7 IgM of the SG33-del group were significantly higher than those of the SG33-VP2 group between D58 and D65 ( $p < 0.001$ ). Before challenge, only the sheep vaccinated with the inactivated vaccine possessed anti-VP7 IgG (Fig. 4A). These animals showed a boost of the IgG response at two days post-challenge. All the other sheep seroconverted after BTv-8 challenge between D49 and D53.

**Table 1**  
 Individual BTv-8-neutralising antibody titres of sheep after vaccination (day 0) and during the course of the challenge. Titres are expressed as the  $\log_{10}$  of the reciprocal of the highest final dilution serum that provided at least 50% protection in Vero cell monolayers and expressed as the effective dose 50% (ED<sub>50</sub>) calculated by the Spearman–Kärber method [31]. The data for individual sheep are presented.

Treatment/sheep	Titres of BTv-8 neutralising antibodies								
	Days after primary vaccination	Challenge							
		0	24	45	48	51	54	58	65
<b>SG33-del</b>									
518	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	56	760	2140	
568	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	40	632	–	
606	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	–	–	–	
742	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	40	270	900	
696	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	40	1516	1070	
<b>SG33-VP2</b>									
597	≤10	≤10	≤10	≤10	40	760	1780	3556	
627	≤10	≤10	≤10	≤10	136	280	894	2418	
627b	≤10	≤10	100	28	316	900	2140	1276	
664	≤10	≤10	120	48	316	2143	1780	3990	
769	≤10	≤10	40	≤10	160	2140	1516	3020	
<b>SG33-VP2/5</b>									
427	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	120	316	2518	
467	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	140	1074	3036	
659	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	100	1516	4276	
778	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	900	6040	2518	
728b	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	120	5020	7096	
<b>Inac-BTV8</b>									
111	≤10	≤10	100	32	56	320	1520	1262	
273	≤10	≤10	180	68	386	1780	4274	3028	
614	≤10	≤10	68	40	2140	5020	8530	6038	
620	≤10	≤10	68	80	260	1080	3027	3516	
632	≤10	≤10	100	268	1074	5020	7096	5024	

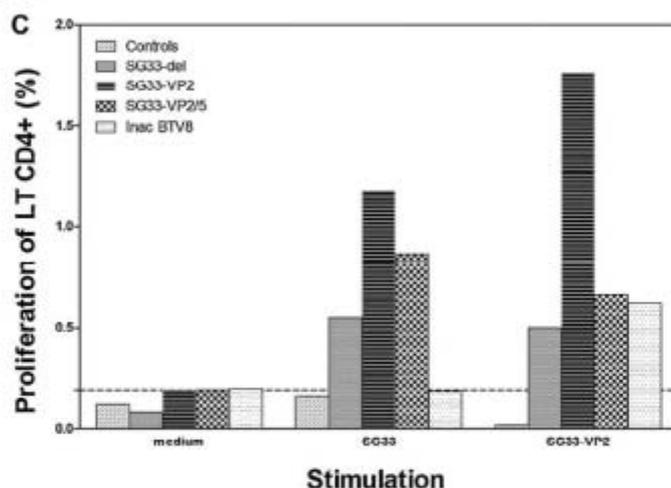
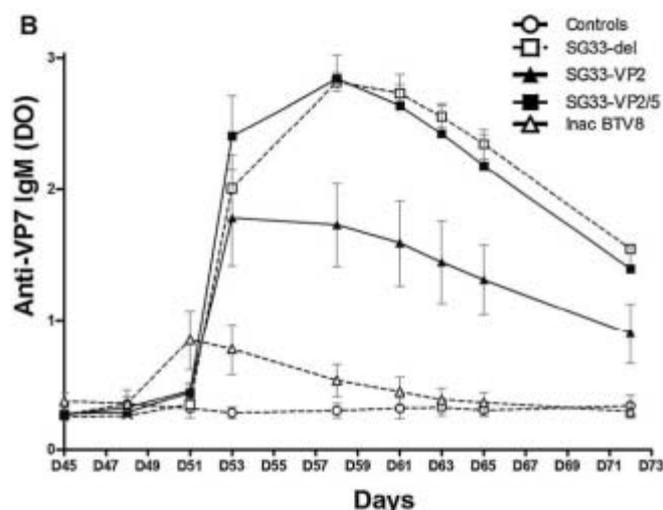
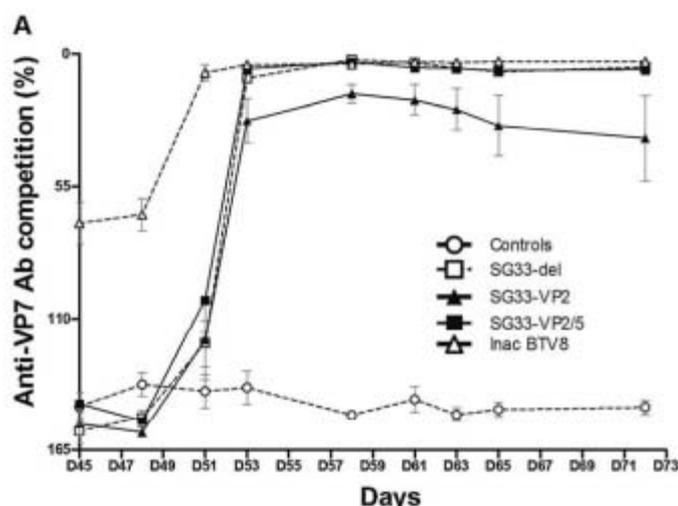


**Fig. 3.** Quantification of blood VP1-encoding mRNA by RT-qPCR during the course of the challenge (D45 of challenge to D65). mRNA copies were measured using a plasmid external reference, and the results were expressed as log<sub>10</sub> RNA copies/mL of blood.

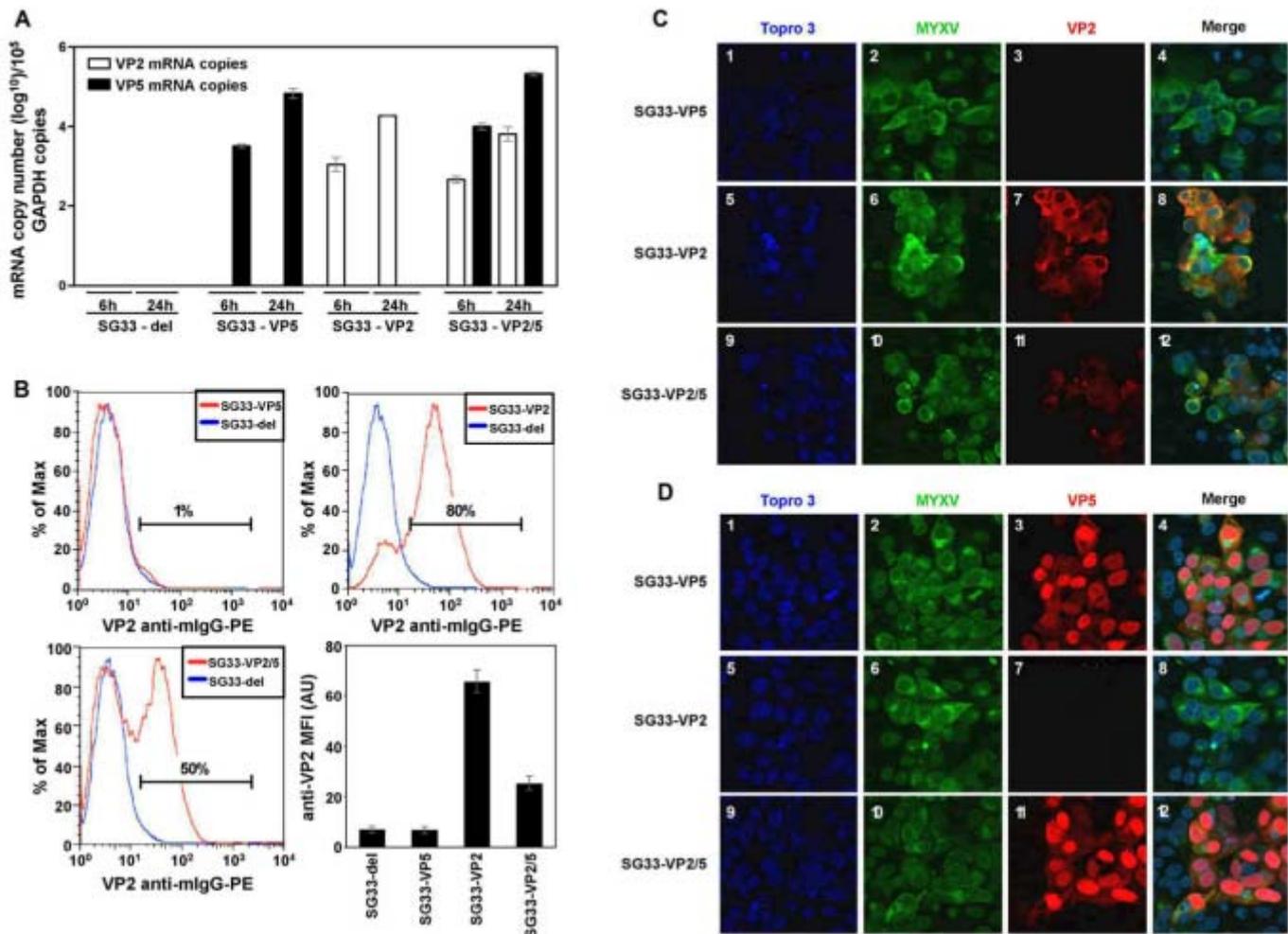
We also tested the CD4 T cell response twenty days post-challenge (D65) in the three sheep per group that developed the highest neutralising antibody responses. No CD4 proliferation was detected in the control group and in the culture with medium only. In the presence of SG33-del, CD4 proliferation was observed in the SG33-del, SG33-VP2/5, and SG33-VP2 groups (Fig. 4C). Similarly, when PBMCs were stimulated in the presence of SG33-VP2, the percentage of dividing CD4 T cells was higher in the SG33-VP2 group (1.7%) than in the SG33-VP2/5 (0.7%), Inac BTv-8 (0.6%) and SG33-del (0.5%) groups. These results suggest that priming of the CD4 T cell response against VP2 antigen was induced by immunisation with SG33-VP2.

**3.4. Difference of VP2 expression between SG33-VP2 and SG33-VP2/5**

To further explain the differences in protection observed between SG33-VP2 and SG33-VP2/5, we investigated the VP2 and VP5 transcription and expression for each recombinant construct. After 6 or 24 h of infection, the number of VP5 RNA copies was 4-fold higher in SG33-VP2/5-infected RK13 cells than in SG33-VP5-infected cells (Fig. 5A,  $p < 0.05$ ). The number of VP2 RNA copies was 4-fold higher with SG33-VP2 than with SG33-VP2/5 ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Anti-VP7 antibody response during the course of the challenge: (A) Amounts of antibodies specific for VP7 were determined using competitive ELISA. The results are expressed as percentages of competition with an anti-VP7 conjugated monoclonal antibody. (B) Anti-VP7 IgM response: mean titres of IgM antibodies against VP7 in the five groups were determined using a capture ELISA. The results are expressed as optical densities. (C) Assessment of CD4 T cell response after BTv-8 challenge. PBMCs (3 animals/group) were stained with CFSE and stimulated with SG33-del or SG33-VP2 crude virus preparation for 4 days. The resulting proliferation was determined by CFSE dilution on CD2 and CD4 double positive cells after acquisition by FACS on at least 5000 events.



**Fig. 5.** (A) RT-qPCR analysis (7500 Real Time PCR system) of VP2 and VP5 transcript expression in RK13 cells ( $1 \times 10^6$ ) infected with SG33-del, SG33-VP2, SG33-VP5 and SG33-VP2/5 (m.o.i. of 1) at 6 and 24 h post infection. Absolute quantification of VP2 (white boxes) and VP5 (black boxes) were normalised with  $10^5$  copies of GAPDH gene and expressed as  $\log_{10}$  of RNA copies. Standard deviations are indicated. The PCR was performed under the following conditions: denaturation (95 °C, 2 min) and 40 amplification cycles (95 °C, 15 s and 60 °C, 45 s). (B) RK13 cells were infected (m.o.i. of 1) with SG33-del, SG33-VP2, SG33-VP5, SG33-VP2/5. At 24 h pi, cells were stained for intracellular MYXV and VP2, and analysed by flow cytometry. The percentage of VP2-positive infected cells is shown for SG33-del, SG33-VP5, SG33-VP2 and SG33-VP2/5 and the MFI determined by FlowJo software on VP2 positive cells. C and D) VP2 (C) and VP5 (D) protein expression in RK13 cells infected (m.o.i. of 1) with SG33 recombinant viruses. At 24 h pi, cells were fixed, treated with an anti-MYXV rabbit hyper-immune serum (green), with mouse polyclonal anti-VP5 (a red) or anti-VP2 (b red), followed by Topro for DNA staining (blue), and analysed by confocal microscopy with a 60 $\times$  objective.

When the results were normalised to the number of SG33 M071L transcripts in each condition, the number of VP2 RNA copies was 2.5-fold higher for SG33-VP2 than for SG33-VP2/5, whereas the number of VP5 RNA copies was similar between the two vectors (data not shown).

At the protein level, a similar amount of VP5 protein (Fig. 5D-3 and D-11) was detected at 24 h pi between the two recombinants, and the protein was essentially localised in the nucleus. Cells positive for SG33 were all positive for VP5, regardless of whether the SG33-VP5 or SG33-VP2/5 vector was used. In contrast, the VP2 protein was shown to be mainly located in the cytoplasm, and its expression seemed to be lower when expressed by SG33-VP2/5 than by SG33-VP2 (Fig. 5C-7 and C-11). Indeed, part of the cells positive for SG33 staining were found to be negative for VP2 upon SG33-VP2/5 infection, which was not the case for the SG33-VP2 infection. VP2 expression was then assessed by flow cytometry under the same conditions (Fig. 5B). The percentage of VP2-positive cells was significantly higher for SG33-VP2 (80%) than for SG33-VP2/5 (50%) ( $p < 0.05$ ). Furthermore, in the VP2-positive cell population, the mean fluorescence intensity was 2.6-fold higher for SG33-VP2 (MFI = 66) than for SG33-VP2/5 (MFI = 25.5) ( $p < 0.05$ ).

Taken together, these data suggest that a 4- to 6-fold increase in VP2 expression was achieved by SG33-VP2.

#### 4. Discussion

In this study, we confirmed that MYXV is able to stimulate a protective immune response against a major disease in sheep. In addition, MYXV was shown to be compatible with a DIVA strategy, as VP7 antibody responses were detected only after challenge in SG33-immunised sheep. Using a highly virulent BTV-8 challenge, we showed that MYXV-SG33 expressing the major neutralising VP2 antigen induced significant clinical protection, albeit less than that provided by the inactivated vaccine. Indeed, only partial virological protection was observed in the SG33-VP2 group after challenge. The correlation between the minimal levels of RNA copies associated with the minimal number of infectious viral particles capable of being transmitted has not been determined to date. Hamers et al. reported that BTV could not be isolated in cell culture when the quantity of BTV RNA was less than  $3.14 \log_{10}$  copies [29]. Using this threshold, it is clear that the blood of the two SG33-VP2 sheep that showed minor clinical signs was infectious for biting insects.

Therefore, the present protocol of immunisation with SG33-VP2 would not completely block BTV-8 transmission and virus spread in the environment.

Fully protected sheep in the Inac-BTV-8 ( $n=5$ ) and SG33-VP2 groups ( $n=3$ ) all possessed neutralising antibodies at D45 of challenge, suggesting that the presence of neutralising antibodies is likely to protect against a challenge with the same serotype. The fact that, after BTV-8 challenge, the two other SG33-VP2 sheep developed neutralising antibodies three days earlier than the control animals suggests that SG33-VP2 already primed the neutralising antibody response and offered the partial clinical protection that was observed. We also showed that immunisation with SG33-VP2 was able to induce an immune T helper (Th) cell response against both the vector and the recombinant antigen. However, the role of the Th response in protection against bluetongue disease is controversial and needs to be more clearly defined; Inac-BTV-8 sheep were fully protected despite the absence of a detectable Th response.

Two other recombinant poxviruses were assessed for protection against bluetongue disease. A canarypoxvirus expressing both VP2 and VP5 conferred full protection against a BTV-17 challenge after two injections [10], whilst a mixture of capripoxviruses expressing VP2, VP7, NS1 and NS3 proteins conferred limited protection against a BTV-2 challenge after a single immunisation [15]. SG33-VP2 seems to provide intermediate protection between these two candidates. However, a comparison is not straightforward because of major differences in the immunisation protocols, including the type of BTV antigens used, the poxvirus constructs and the BTV challenge, amongst these studies. In addition, vaccination with an inactivated vaccine was not included as a positive control. Our immunisation protocol was most similar to that of Boone et al. [10] in that a non-replicative vector and the VP2 or VP5 genes under the control of the very same promoters were used. Boone et al. obtained full protection with the canarypoxvirus system, but the absence of a precise description of the clinical signs in the control group rendered the comparison of the protection very difficult. In our study, two out of five sheep in the control group died from bluetongue disease, which was not the case in the five highly susceptible Polled Dorset control sheep in the canarypoxvirus study [10]. On the other hand, Boone et al. [10] showed full viral protection in immunised animals, which was not the case in this study.

In regards to the two VP2 and VP2/5 constructs, the very limited protection observed after immunisation with SG33-VP2/5 was unexpected. We therefore examined the level of protein expression in more detail and observed a 4- to 6-fold lower level of VP2 production by SG33-VP2/5 in RK13 cells. It is unknown whether this difference in VP2 expression is sufficient to explain the differences in protection against BTV-8. However, it has been shown that a two-fold difference in the amount of VP2 (produced with a baculovirus) influenced the development of the immune response upon immunisation and protection against BTV challenge [22]. We hypothesise that for the SG33-VP2 immunisation, the level of VP2 expression was very close to the expression level necessary to induce protection, whereas the expression of VP2 by SG33-VP2/5 was lower and not sufficient to prime a protective response. New experiments using different doses of the VP2 antigen will be necessary to test this hypothesis.

The reason for the lower VP2 production in SG33-VP2/5 could not precisely be determined. Similar levels of infection were observed in RK13 cells between the two recombinant viruses (data not shown). In sheep, both vectors had achieved levels of expression that primed a similar anti-MYXV antibody response at the day of challenge. The differential L2 mRNA transcription between SG33-VP2 and SG33-VP2/5 was 2.5, which was lower than the differential 4–6-range of VP2 expression. This suggests that factors other than transcription may have influenced the VP2 expression level. The

two BTV L2 and M5 genes were cloned in the reverse complementary orientation in the SG33-VP2/5 construct. Therefore, abnormal transcriptional elongation cannot be excluded, which would indicate a possible interaction between the L5 and L2 mRNAs and an impaired translation of the VP2 protein.

We could not determine from our study whether VP5 influences (positively or negatively) the immunogenicity of VP2 because the level of VP2 production was different between the two vectors. On the other hand, VP5 co-expression was unable to compensate for the lower VP2 expression in protecting sheep from BTV challenge. A canarypoxvirus expressing VP2 and VP5 was shown to protect sheep against homologous challenge, but no comparative VP2 group was present in the study [10]. Lobato et al. [14] showed that three immunisations with a VACV encoding VP2 alone induced significant neutralising titres and protected all sheep against a BTV-1 challenge, whilst immunisation with VACV encoding VP2 plus VP5 protected only four out of six sheep. Unfortunately, there was no explanation of the differences, and the levels of BTV protein expression were not assessed in this study [14] or in other studies using poxviruses as vaccine vectors [10,15,30]. In the baculovirus expression, the presence of VP5 in combination with VP2 was shown to enhance the neutralising antibody response during protection in vaccinated sheep [22]. The differences between the two expression systems may be explained by the total or respective amounts of VP2 and VP5, the two protein conformations or localisation and further presentation to the immune system. In our study, the two proteins did not colocalise in RK13 cells. The presence of VP5 in the nucleus was surprising, considering the cytoplasmic cycle of MYXV and the absence of detectable VP5 in the nucleus after BTV infection (data not shown). Interaction of the VP5 protein with a MYXV and/or a cellular protein may induce translocation to the nucleus. Unfortunately, no data are available regarding VP5 cellular localisation when expressed by other poxviruses [10,14].

Taken together, our results suggest that careful examination of recombinant gene expression mediated by viral vectors must be conducted prior to discussing the role of each antigen in protection against a disease. Many parameters may influence the efficacy of a poxvirus vector *in vivo*. At least a minimal amount of VP2 seems to be required in the poxvirus system to stimulate a strong and protective immune response. Finally, we provided *in vivo* evidence on the suitability of MYXV as a recombinant vector for sheep vaccination. However, further experiments are necessary to improve the efficacy of MYXV vectorisation in sheep, and these experiments will be important for designing immunisation studies against highly virulent diseases such as bluetongue.

## Acknowledgements

The authors thank Faouzi Lyarzhri for help with the statistical analyses, M. Moulignié and Brigitte Peralta for technical assistance. This work was financed by the VacGenDC ANR-06-GANI-015 project and by a grant from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) and CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) to ST.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.108.

## References

- [1] Liniger M, Zuniga A, Naim HY. Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2007;6:255–66.

- [2] Jacobs B, Langland JO, Kibler KV, Denzler KL, White SD, Holeczek SA, et al. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res* 2009;84:1–13.
- [3] Moss B, Carroll MW, Wyatt LS, Bennink JR, Hirsch VM, Goldstein S, et al. Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 1996;397:7–13.
- [4] Berencsi K, Gyulai Z, Gőnczöl E, Pincus S, Cox WI, Michelson S, et al. A canary-pox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *J Infect Dis* 2001;183:1171–9.
- [5] Liu M, Acres B, Ballou JM, Bizouarne N, Paul S, Slos P, et al. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(Suppl. 2):14567–71.
- [6] Gomez CE, Najera JL, Krupa M, Esteban M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 2008;8:97–120.
- [7] Currier JR, Ngayu V, de Souza MS, Ratto-Kim S, Cox JH, Polonis VR, et al. Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. *PLoS One* 2010;5:e13983.
- [8] Goepfert PA, Elizaga ML, Sato A, Qin L, Cardinali M, Hay CM, et al. Phase I safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J Infect Dis* 2011;203:610–9.
- [9] Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M, et al. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann NY Acad Sci* 2002;969:88–91.
- [10] Boone JD, Balasuriya UB, Karaca K, Audonnet JC, Yao J, He L, et al. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* 2007;25:672–8.
- [11] Pignolet B, Duteyrat JL, Allemandou A, Gelfi J, Foucras G, Bertagnoli S. In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains. *Virology* 2007;4:94–9.
- [12] Top S, Foulon E, Pignolet B, Deplanche M, Caubet C, Tasca C, et al. High infection rate of non-host species dendritic cells by an attenuated myxoma virus induces gene expression predicting its efficacy as a vaccine vector. *J Virol* 2011;85:12982–94.
- [13] Pignolet B, Boullier S, Gelfi J, Bozzetti M, Russo P, Foulon E, et al. Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants. *J Gen Virol* 2008;89:1371–9.
- [14] Lobato ZI, Coupar BE, Gray CP, Lun R, Andrew ME. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59:293–309.
- [15] Perrin A, Albina E, Breard E, Sailleau C, Prome S, Grillet C, et al. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* 2007;25:6774–83.
- [16] Gould AR. Conserved and non-conserved regions of the outer coat protein, VP2, of the Australian bluetongue serotype 1 virus, revealed by sequence comparison to the VP2 of North American BTV serotype 10. *Virus Res* 1988;9:145–58.
- [17] Gould AR, Eaton BT. The amino acid sequence of the outer coat protein VP2 of neutralizing monoclonal antibody-resistant, virulent and attenuated bluetongue viruses. *Virus Res* 1990;17:161–72.
- [18] Jeggo MH, Wardley RC, Brownlie J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Prog Clin Biol Res* 1985;178:477–87.
- [19] Takamatsu H, Jeggo MH. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology* 1989;66:258–63.
- [20] Andrew M, Whiteley P, Janardhana V, Lobato Z, Gould A, Coupar B. Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1985;47:311–22.
- [21] Takamatsu H, Burroughs JN, Wade-Evans AM, Mertens PP. Identification of a bluetongue virus serotype 1-specific ovine helper T-cell determinant in outer capsid protein VP2. *Virology* 1990;177:396–400.
- [22] Roy P, Urakawa T, Van Dijk AA, Erasmus BJ. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J Virol* 1990;64:1998–2003.
- [23] Saurat P, Gilbert Y, Ganiere JP. Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev Med Vet* 1978;129:415–51.
- [24] Perkus ME, Limbach K, Paoletti E. Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system. *J Virol* 1989;63:3829–36.
- [25] Tine JA, Lanar DE, Smith DM, Welde BT, Schulteiss P, Ware LA, et al. NYVAC-PF7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 1996;64:3833–44.
- [26] Blanie S, Mortier J, Delverdier M, Bertagnoli S, Camus-Bouclainville C. M148R and M149R are two virulence factors for myxoma virus pathogenesis in the European rabbit. *Vet Res* 2009;40:11.
- [27] MacLachlan NJ, Crafford JE, Vernau W, Gardner IA, Goddard A, Guthrie AJ, et al. Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet Pathol* 2008;45:310–5.
- [28] Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171:131–7.
- [29] Hamers C, Galleau S, Chery R, Blanchet M, Besancon L, Cariou C, et al. Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle. *Vet Rec* 2009;165:369–73.
- [30] Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor P, Takamatsu H, Anderson J, Thevasagayam J, et al. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology* 1996;220:227–31.
- [31] Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*, second edition Oxford/London/Edinburgh/Malden/Carlton/Paris: Blackwell Science Ltd.; 1995.

### 3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons confirmé *in vivo* le concept d'utilisation du MYXV comme vecteur vaccinal chez les ruminants. L'immunisation de moutons, par deux injections successives du recombinant SG33-VP2, a permis d'induire la production d'anticorps neutralisants et de protéger cliniquement les moutons contre une inoculation d'épreuve à BTV-8. Ces données sont validées par la sévérité des signes cliniques et la mortalité, observées chez les animaux contrôles non vaccinés. Par ailleurs l'utilisation de ce vecteur est compatible avec une stratégie DIVA, puisque tous les moutons immunisés avec les recombinants SG33 ont produit une réponse anticorps anti-VP7 uniquement après l'inoculation du BTV-8.

Toutefois des études supplémentaires apparaissent nécessaires pour augmenter l'efficacité du candidat SG33-VP2. En effet la protection induite s'est révélée plus faible que celle produite par le vaccin inactivé Alsap-8. La différence de protection clinique n'est pas significative. Par contre il est clair que la protection virologique apportée par le SG33-VP2, contrairement à celle du vaccin inactivé, n'est que partielle. Les résultats de RT-qPCR chez au moins 2 moutons vaccinés SG33-VP2, suggèrent très fortement que ces animaux étaient infectieux après inoculation d'épreuve. Le candidat SG33-VP2, dans la formulation utilisée, n'empêche donc pas la transmission du BTV-8.

D'autres poxvirus ont été testés chez les petits ruminants pour leur capacité à protéger contre la FCO. Un *Canaripoxvirus* exprimant à la fois les protéines VP2 et VP5, a permis une protection clinique et virologique homologue contre le BTV-17 après 2 injections (Boone, 2007) alors qu'un mélange de *Capripoxvirus* recombinants, exprimant respectivement les protéines VP2, VP7, NS1 et NS3, n'a induit, après une seule immunisation, qu'une protection limitée contre une inoculation homologue à BTV-2 (262). La protection induite par le SG33-

VP2 semble intermédiaire comparée aux recombinants *Canaripoxvirus* et *Capripoxvirus*. Cependant, il est difficile de faire des comparaisons précises car les expériences différaient les unes des autres par le protocole d'immunisation, la nature des antigènes du BTV, la construction des poxvirus ainsi que le modèle d'inoculation d'épreuve du BTV. Plus particulièrement il n'est possible de comparer une efficacité clinique, que si les animaux des groupes contrôles de chaque étude présentent des degrés de sévérité similaires de la maladie, ce qui n'est pas le cas avec le canaripoxvirus. De plus, les deux expériences décrites ci-dessus n'utilisaient pas de vaccins inactivés comme étalon de référence. Dans une des deux études au moins, ce vaccin n'était pas disponible.

La protection contre le BTV est en partie corrélée à la présence d'anticorps neutralisants la protéine VP2 au jour de l'inoculation d'épreuve, comme le suggère notre étude. Ce résultat confirme ceux déjà obtenus avec des vaccins inactivés (251) et souligne l'importance de la réponse humorale dans la protection vaccinale. Toutefois il a été décrit la possibilité d'une protection totale chez des moutons, en l'absence d'anticorps neutralisants détectables (293). Dans notre étude, les deux moutons immunisés avec du SG33-VP2 ne possédant pas d'anticorps neutralisants au jour de l'inoculation, ont développé une réponse anticorps neutralisante trois jours plus tôt que les moutons contrôles, suggérant la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire. Nous avons aussi montré que l'immunisation des moutons avec le recombinant SG33-VP2 était capable d'induire une réponse cellulaire T helper à la fois contre le vecteur mais aussi contre l'antigène recombinant. Dans notre première étude, l'infection des DCs par le MYXV est associée à la transcription de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la communication entre cellules de la réponse innée et de la réponse adaptative et dans la polarisation Th1 de la réponse immune adaptative. La réponse cellulaire CD4 pourrait ainsi permettre le développement d'une réponse cytotoxique contre VP2, similaire à celle décrite lors d'infection naturelle (162). Toutefois, ces résultats restent

préliminaires et l'importance de la réponse cellulaire dans la protection contre le BTV est quasi inconnue dans le cadre de l'utilisation de vecteurs poxviraux. Dans notre étude, le rôle de la réponse T helper dans l'induction de la protection contre la maladie reste discutable puisque les moutons vaccinés avec le vaccin Alsap-8, n'ont pas développé de réponse cellulaire T helper tout en étant parfaitement protégés contre la maladie.

Contrairement à ce qui était attendu, il n'a pas été observé de protection des moutons avec le vecteur SG33-VP2/5. Les raisons ne sont pas clairement établies mais, au vu des résultats, il est probable que le niveau d'expression de VP2 joue un rôle. Nous avons en effet montré *in vitro* que le recombinant SG33-VP2/5 exprimait 4 à 6 fois moins de VP2 que le SG33-VP2. Roy et al, en 1990, ont montré que trois injections successives de 50µg de VP2 produite en baculovirus, étaient insuffisantes pour induire une protection complète contre la FCO, alors que deux injections successives de 100µg de la même protéine VP2, conférait une protection complète (282). Cela suggère qu'une différence d'un facteur deux de la quantité de la protéine VP2 peut influencer l'efficacité de la réponse immune protectrice. Par ailleurs dans d'autres systèmes poxvirus, il a été montré chez la souris que le niveau d'épitopes exprimés à la surface des cellules pouvait influencer la taille de la population de LT *in vivo*, mais aussi l'induction à la fois des réponses humorale et cellulaire spécifiques. Nous pouvons ainsi formuler l'hypothèse que le niveau d'expression de VP2 produite par SG33-VP2 est à la limite du niveau minimal nécessaire à l'induction d'une réponse protectrice (expliquant la protection non totale) et que le niveau de VP2 produit par SG33-VP2/5 n'est, par conséquent, pas suffisant pour induire une réponse immune protectrice. De nouvelles expériences avec des doses différentes d'antigène VP2 sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Dans un contexte poxvirus, il semble que le niveau minimal de production de VP2 soit un critère d'efficacité plus important que la présence ou non de la protéine VP5. Dans notre étude, nous ne pouvons conclure si VP5 agit positivement ou négativement sur

l'immunogénicité de la protéine VP2, puisque le niveau d'expression de VP2 est déjà différent entre les deux vecteurs. Ce que nous pouvons en déduire, c'est que la présence de VP5 n'a pas été capable de compenser le faible niveau d'expression de VP2. Le rôle de VP5 dans l'immunogénicité de la protéine VP2 n'a été que très peu étudié et les données disponibles sont différentes si les protéines sont exprimées en système baculovirus ou poxvirus (30, 197, 262, 278). Cette différence peut s'expliquer en partie par la différence de niveau d'expression de VP2 et VP5, du ratio entre VP2 et VP5 dans chaque système, de la possibilité de la formation d'un complexe conformationnel entre VP2 et VP5, de la localisation des protéines et de leur présentation au système immunitaire. Dans notre étude, les protéines VP2 et VP5, ne colocalisent pas dans les cellules RK13, puisque la protéine VP5 est principalement localisée dans le noyau alors que la protéine VP2 est exclusivement cytoplasmique. De plus, après infection de cellules BHK21 par du BTV-8, VP5 est localisée dans le cytoplasme (données non montrées). Aucun signal de localisation nucléaire n'a été trouvé sur la séquence de VP5. Il est possible que la protéine VP5 puisse s'associer à une protéine du MYXV et/ou cellulaire pour la translocation dans le noyau.

En conclusion les résultats présentés dans cette partie suggèrent que de multiples paramètres peuvent influencer l'efficacité d'un vecteur poxvirus, *in vivo*. Par conséquent il apparaît primordial de définir précisément les modalités de production des antigènes par les vecteurs recombinants avant de conclure à la supériorité d'un système sur un autre. En effet, une quantité minimale d'antigène VP2 semble être requise pour stimuler une réponse immune suffisamment forte pour induire une protection.

Enfin, les résultats obtenus avec le SG33-VP2 soulignent l'intérêt de ce vecteur pour la vaccination des ruminants. Des expériences supplémentaires apparaissent cependant nécessaires pour améliorer l'efficacité de la vectorisation du MYXV chez les moutons dans le

cadre de la vaccination contre la bluetongue, comme déterminer la dose minimale de VP2 pour induire une protection complète contre une épreuve virulente.

## **B. Evaluation du pouvoir protecteur du recombinant SG33 exprimant la protéine structurale VP7**

### **1. Introduction**

Nous avons précédemment montré que l'immunisation par un recombinant MYXV exprimant la protéine sérotype spécifique VP2, était capable d'induire une réponse immune à la fois humorale et cellulaire pouvant conférer une protection partielle mais significative contre une épreuve homologe hyper-virulente de BTV-8. Cela confirme la pertinence de l'utilisation du MYXV en tant que vecteur vaccinal chez les ovins. Dans cette continuité nous avons évalué la capacité d'un recombinant SG33 exprimant la protéine structurale VP7 à induire une réponse immune cellulaire, permettant une protection hétérologue.

La protéine VP7 étant relativement conservée entre les sérotypes du BTV, elle porte la spécificité de groupe. Par ailleurs VP7 est impliquée dans la réponse LTh contre le virus BTV (158). Sur la base de ces connaissances, il a été proposé que VP7 puisse participer à l'induction d'une réponse protectrice contre plusieurs sérotypes du BTV.

A ce jour, deux études ont permis de démontrer le rôle de la protéine VP7 dans la protection contre une épreuve virulente, l'une utilisant un système d'expression baculovirus et l'autre poxvirus. Pearson et Roy, en 1993 ont montré que les moutons immunisés avec des CLP contenant uniquement les protéines VP7 et VP3 du BTV-10 étaient partiellement protégés contre une inoculation d'épreuve homologe (BTV-10), mais aussi contre plusieurs inoculations d'épreuve hétérologue (BTV-2, -4, -11, -20 et -23), sans présence d'anticorps neutralisants. De plus des souris immunisées avec ces mêmes CLP, développent des CTL capables de lyser les cellules infectées par un recombinant exprimant les protéines VP7 et VP3 (260). Une autre étude a permis de démontrer qu'une immunisation avec un vaccin recombinant capripoxvirus exprimant la protéine VP7 du BTV-1, pouvait induire une

protection partielle contre à la fois une inoculation d'épreuve homologue (BTV-1) et hétérologue (BTV-3), en l'absence totale d'anticorps neutralisants, suggérant l'implication d'une réponse cellulaire dans la protection contre la maladie (346). Dans cette étude, les animaux témoins et vaccinés ont développés des signes cliniques lors de l'infection avec le BT-3, mais seuls les animaux vaccinés à l'aide du recombinant *Capripoxvirus* exprimant la protéine VP7 ont survécu.

Pour confirmer et affiner ces études, nous avons utilisé un vecteur SG33 exprimant la VP7 (SG33-VP7) du BTV-2. Par ailleurs, dans le but d'augmenter l'immunogénicité du vecteur SG33-VP7, l'utilisation de molécules immunomodulatrices comme le GM-CSF et l'IFN $\alpha$ , en tant qu'adjuvant a été envisagée. Les propriétés du GM-CSF en tant qu'adjuvant reposent notamment sur sa capacité à stimuler localement la prolifération et la maturation des CPA, comme les cellules de Langherans et les cellules dendritiques présentes au niveau du site d'injection, à activer les macrophages et à augmenter l'expression des antigènes du CMH II (64, 359). De plus, l'injection de GM-CSF augmenterait le nombre de DC activées au niveau des nœuds lymphatiques, ce qui permettrait d'amplifier la réponse immune à médiation cellulaire et humorale (267). Quand aux IFN de type I, parmi lesquels les IFN $\alpha$ , ils activent les cellules dendritiques et délivrent des signaux qui permettent l'activation des LT. Ils amplifient à la fois la réponse cytotoxique et la réponse humorale et constituent des adjuvants potentiellement très efficaces contre les infections virales (55, 333).

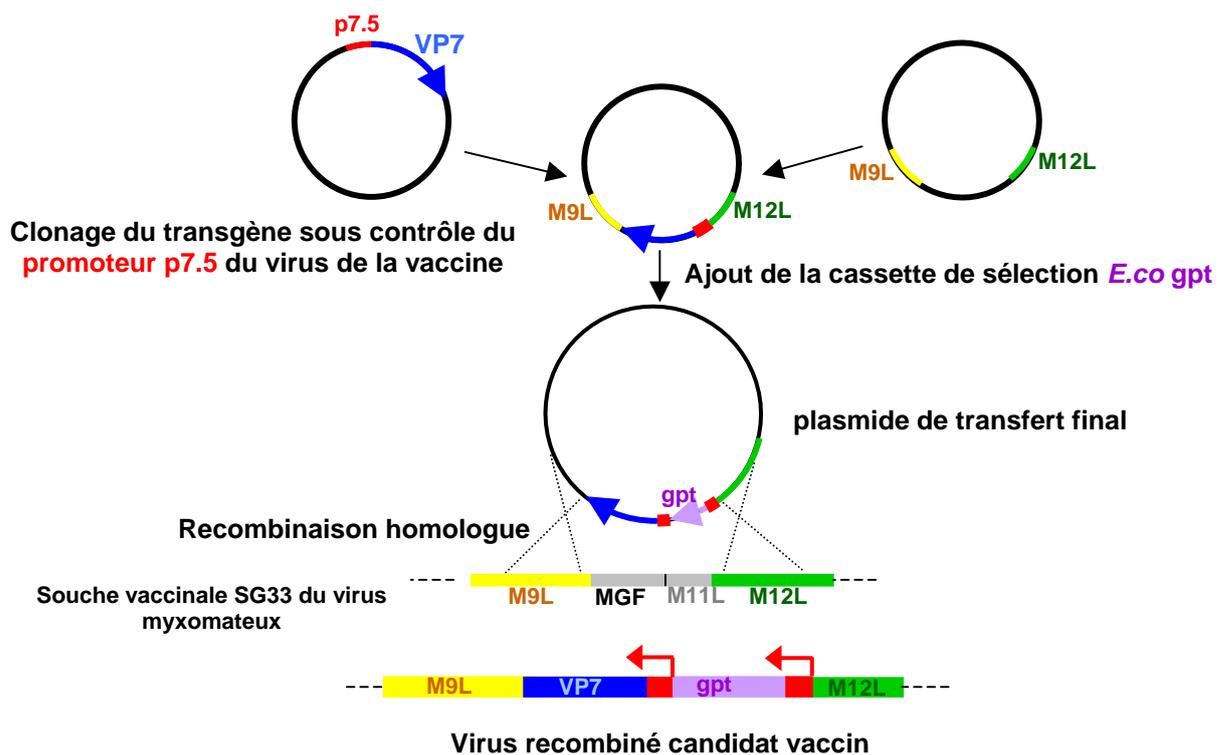
## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Cellules et virus

Les cellules rénales de lapin 13 (RK13, ATCC CCL-37) et les cellules Vero (ATCC CCL-81) sont maintenues dans du milieu DMEM additionné de pénicilline à 100UI/ml final et streptomycine à 100µg/ml, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF).

Les PBMC sont maintenues dans du milieu RPMI 1640 Glutamax, 25mM Hepes (Gibco-BRL) supplémenté avec 10% de SVF, 1% de pyruvate de sodium (Gibco-BRL), 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de β-mercapto-ethanol, de pénicilline à 100UI/ml final et streptomycine à 100µg/ml.

Le virus recombinant SG33-VP7 était déjà disponible (263). Brièvement, le plasmide de transfert pVP7 a été obtenu par insertion du gène codant pour la protéine VP7 du BTV-2 sous la dépendance d'un promoteur précoce-tardif p7.5 dans le plasmide pAT-GPT, qui lui-même contenait les séquences homologues du MYXV, M009L et M012L ainsi que la cassette de sélection E co-GPT. Le SG33-VP7 a été obtenu par recombinaison homologue après infection des cellules RK13 par la souche SG33 du MYXV et après transfection avec le plasmide pVP7 (**Figure 17**). Les virus SG33 recombinés sont propagés sur cellules RK13 en milieu DMEM (Dabelco's Minimal Eagle Medium, Gibco ®) additionné de pénicilline à 100 UI/ml final et streptomycine à 100 µg/ml, supplémenté avec 2% de SVF. La sélection des virus recombinés gpt+ a été réalisée dans le milieu de sélection MX-HAT constitué de DMEM 5 % SVF supplémenté en acide Mycophénolique 25 µg/mL (Sigma), en Xanthine 250 µg/mL (Sigma), en Hypoxanthine 15 µg/mL, en Aminoptérine 0,176 µg/mL et en Thymidine 4 µg/mL. L'expression de VP7 a été au préalable validée dans les cellules RK13 infectées par le SG33-GFP.



**Figure 17.** Construction du virus recombiné SG33-VP7

## 2.2. Protocole expérimental (Figure 18)

Les moutons obtenus sont issus de croisements de brebis de race Lacaune et de béliers basco-bernais. Ils étaient indemnes de FCO, comme l'ont confirmé les résultats négatifs obtenus par RT-PCRq (taqvet, Lsi, France), par ELISA (Id-Vet VP7, France) et par test de séroneutralisation. Ils ont été divisés en quatre groupes de quatre moutons. Les moutons du groupe 1 n'ont pas été immunisés. Dans les groupes 2, 3 et 4, les moutons ont été immunisés trois fois par voie intradermique à J0, J24 et J90 avec du SG33-GFP purifié seul ( $2 \cdot 10^7$ UFP/mouton, groupe 2), ou en présence de GM-CSF ( $5 \mu\text{g}$ /moutons, groupe 3) ou d'IFN $\alpha$  ( $2 \mu\text{g}$ /moutons, groupe 4), (**Figure 18**). Par la suite 9 moutons immunisés ont été sélectionnés, sur base des résultats obtenus : les quatre meilleurs répondeurs parmi lesquels deux moutons immunisés avec le SG33-VP7 non adjuvé, un mouton immunisé avec SG33-VP7 adjuvé avec du GM-CSF et un mouton immunisé avec SG33-VP7 adjuvé avec l'IFN $\alpha$ , et cinq moutons contrôles, non immunisés. Ces neuf moutons ont été éprouvés avec la souche BTV-8 (W1B2, Allemagne, 2007), dix mois après la première immunisation à J310. L'inoculation d'épreuve a été réalisée par injection sous-cutanée de 10ml de sang infectieux (charge virale =  $2,7 \times 10^6$  dsRNA copies/mL) et par trois injections intradermiques de 1 mL (1mL/injection), d'un surnageant de culture BHK infectées par la même souche virale (titre de  $5 \cdot 10^5$ UFP/ml). Le sang infectieux a été prélevé sur un mouton au pic de la virémie, infecté 6 jours auparavant avec la souche W1B2 du BTV-8. Suite à l'inoculation d'épreuve, un suivi clinique a été réalisé par le même opérateur, tous les jours pendant 17 jours. L'examen clinique comprenait une mesure de la température rectale et la notation de signes cliniques selon un système de score indiqué dans l'étude précédente. Vingt-deux jours après l'inoculation d'épreuve, les animaux ont été euthanasiés sous anesthésie générale par injection de 5 mg/kg de kétamine et de 15 mg/kg de pentobarbital sodique, puis autopsiés.

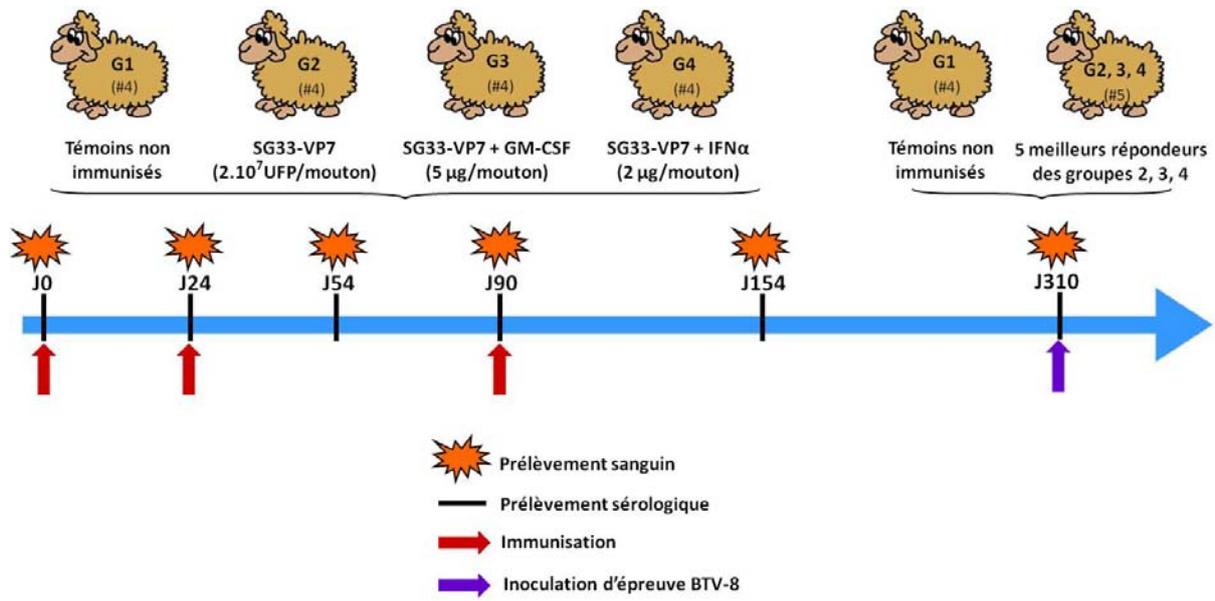


Figure 18. Protocole expérimental

## **2.3. Evaluation de la réponse immunitaire**

### **2.3.1. Réponse cellulaire**

Après isolement, les PBMCs sont marquées au CFSE (Molecular Probes), et analysées selon le protocole décrit lors de la deuxième étude. Elles sont stimulées en présence de milieu, soit de Concanavaline A (ConA, activateur non spécifique des LT, 1µg/ml final), de SG33-VP7 purifié (MOI=1) ou de la protéine VP7 purifiée (1µg/mL final). L'acquisition est réalisée avec un FACScalibur (Becton Dickinson). L'analyse est réalisée avec le logiciel Flowjo.

### **2.3.2. Réponse humorale**

Le sang des moutons a été prélevé dans des tubes secs à J0, J24, J54, J90 et J154. La réponse sérologique contre le MYXV et la protéine VP7 est évaluée en utilisant un ELISA indirect. Brièvement, les plaques ELISA sont coatées avec 1µg de virus purifié SG33-VP7 ou de protéines VP7 pendant toute une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées trois fois en PBS-Tween-BSA et mises en présence des sérums à tester à différentes concentrations. La liaison des anticorps anti-MYXV ou anti-VP7 est visualisée par l'incubation de sérum de cheval anti-IgG de mouton conjuguée à la HRP (horse Raddish peroxydase) (Serotec). Trente cinq minutes après l'ajout de substrat (2,4mg/mL de tétraméthylbenzidine) (Sigma), la réaction est stoppée avec de l'acide sulfurique (1N). La densité optique de chaque échantillon est mesurée à une longueur d'onde  $A_{450nm}$ .

La détection des anticorps anti-VP7 après inoculation d'épreuve a aussi été effectuée à l'aide d'un ELISA par compétition de liaison (ID Screen Bluetongue Competition, ID-VET, Montpellier, France).

La séroneutralisation du vecteur vaccinal SG33, est réalisée en effectuant des dilutions en série de sérums, d'un facteur 4, du 1/6 jusqu'au 1/32, puis mettant les sérums en contact avec

150 UFP de virus SG33 par puits. Après une heure d'incubation à 37°C, le mélange SG33-sérums dilués est ajouté aux cellules RK13, les plaques sont incubées pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu est changé et les plaques sont incubées pendant 48h à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les résultats obtenus sont exprimés en titre viral de la dernière dilution sans effet cytopathique. Les sérums avec des titres supérieurs à 10 sont considérés comme positifs. La séroneutralisation du BTV est réalisée en effectuant des dilutions de sérums de 2 en 2, du ½ jusqu'au 1/5664<sup>e</sup>. Les dilutions sont mises en présence de 100-200 TCID<sub>50</sub> de BTV-8 W1B2 dans des plaques 96 puits. Après 2 heures d'incubation à 37°C, le mélange FCO et sérum est ajouté aux cellules Vero, le milieu est changé et les plaques sont incubées à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 5 à 6 jours. Les résultats obtenus correspondent à l'inverse de la dilution la plus haute qui permet la protection de 50 % des cellules Vero. Ils sont exprimés en DE<sub>50</sub> (dose efficace 50%), calculés selon la méthode de Spearman-Kärber (329).

#### **2.4. Quantification de l'ARN viral**

La virémie a été mesurée quotidiennement pendant 8 jours après l'inoculation d'épreuve, sur l'ensemble des moutons. Le sang des moutons est prélevé dans des tubes EDTA. L'extraction d'ARN de 100µl de sang est effectuée à l'aide du kit d'extraction nucleospin RNA virus (Machery-Nagel). La détection du BTV est réalisée par RT-qPCR sur le gene L1 du BTV avec le kit Taqvet all genotypes (LSI, Lissieu, France). Pour la quantification, une courbe étalon du plasmide est obtenue par dilutions du plasmide pBTVM contenant le réplicon L1 (aimablement fourni par le Dr Sellal, LSI).

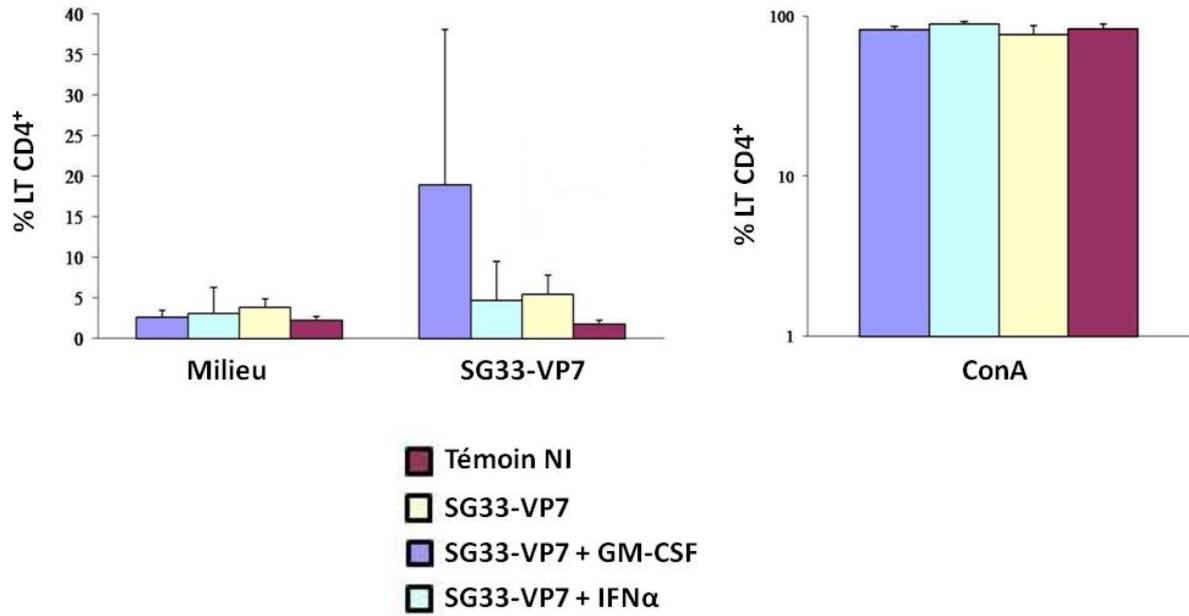
### 3. Résultats

#### 3.1. Réponse immune induite par le recombinant SG33-VP7

##### 3.1.1. Réponse cellulaire

Pour évaluer la capacité du vecteur SGG33-VP7 à induire une réponse immune cellulaire chez les ovins après immunisation, nous avons testé la réponse cellulaire LT CD4<sup>+</sup> dirigée contre le virus recombiné et contre la protéine VP7 sur les PBMC de tous les animaux à J90, à l'aide du test de prolifération des lymphocytes marqués au CFSE.

Les résultats de la lymphoprolifération indiquent que, par rapport aux cellules non stimulées (milieu), la stimulation des lymphocytes en présence de la conA, active bien les LT CD4<sup>+</sup>, suggérant que les LT CD4<sup>+</sup> de tous les animaux sont activables (**Figure 19**). Lorsque l'on compare les groupes de moutons immunisés avec le SG33-VP7, en présence ou non d'adjuvant, avec le groupe de moutons non immunisés, aucune différence significative n'a été observée (Mann-Whitney). Cependant il est à noter une grande hétérogénéité des réponses cellulaires LT CD4<sup>+</sup> individuelles des animaux au sein d'un même groupe. Ainsi, il semblerait que stimulés en présence de SG33-VP7, l'activation des lymphocytes soit plus grande chez les animaux immunisés avec le SG33-VP7 adjuvé avec du GM-CSF, suggérant que l'adjuvant GM-CSF augmenterait l'immunogénicité du vecteur recombinant. Par ailleurs nous avons également étudié la stimulation des LT CD4<sup>+</sup> avec une protéine recombinante VP7 seule mais à ce stade, il nous a été impossible de détecter une réponse LT CD4<sup>+</sup> vis-à-vis de la protéine recombinante du fait de sa trop grande cytotoxicité (données non montrées).



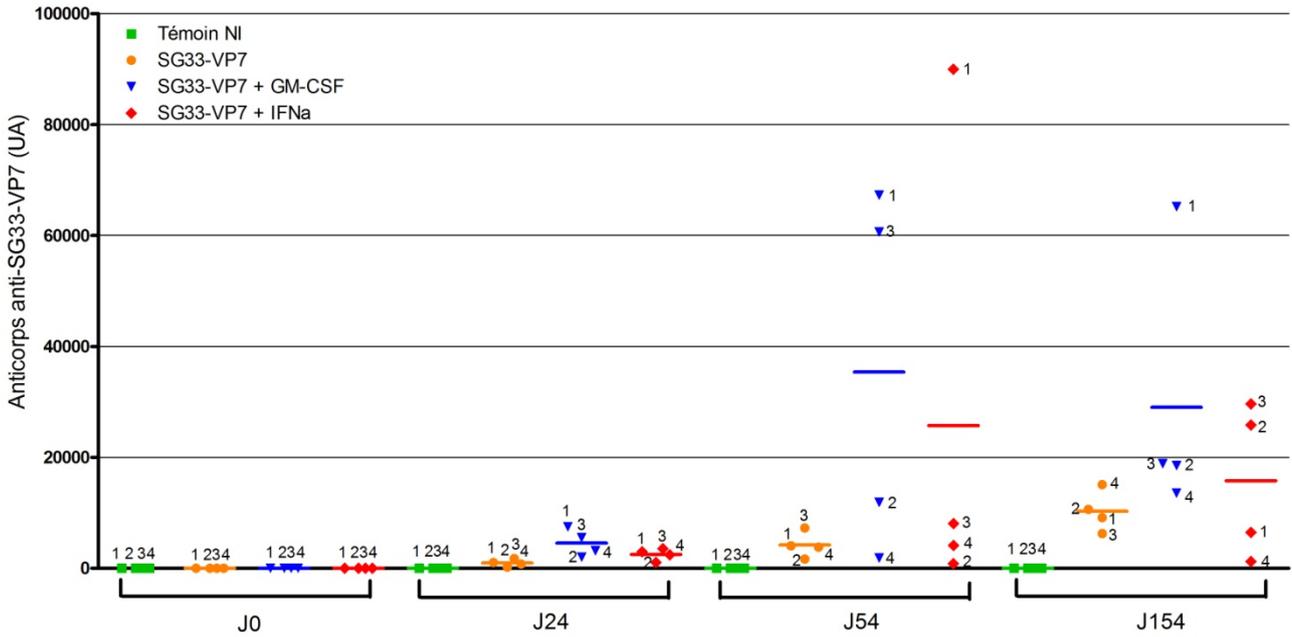
**Figure 19.** Activation des LT CD4 (J90) de l'ensemble des moutons.

### 3.1.2. Réponse humorale

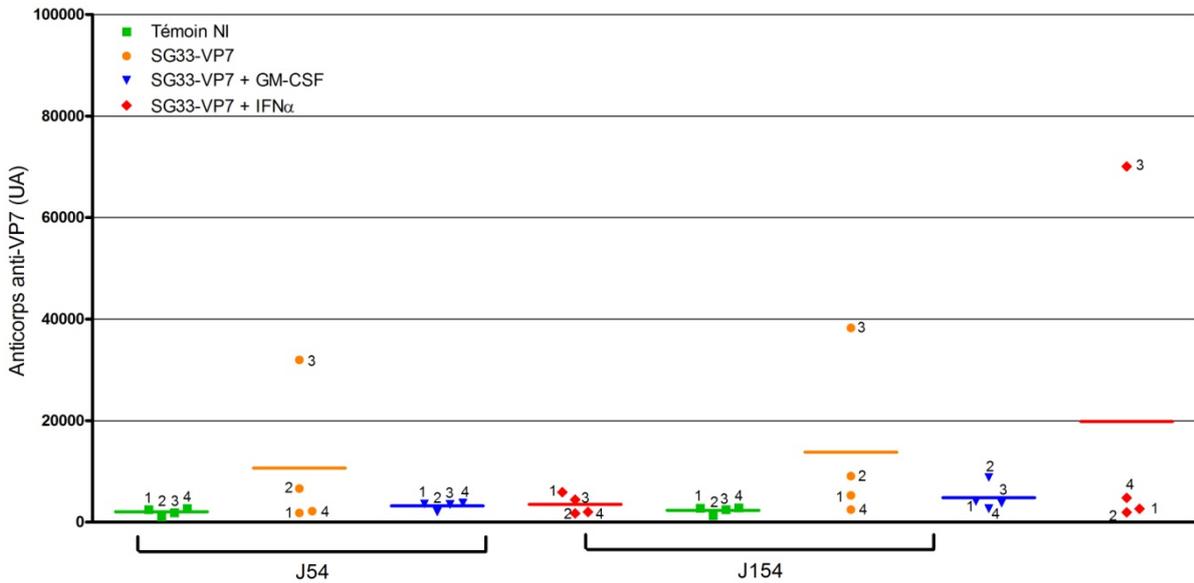
La réponse humorale contre SG33-VP7 (**Figure 20**) ou la protéine VP7 (**Figure 21**) a été obtenue à partir de sérums prélevés après immunisation à J0, J24, J54 et J154. Les moutons immunisés avec le vecteur SG33-VP7 non adjuvé, ne développent une réponse anticorps anti-SG33-VP7 qu'à partir de J54. Les titres d'anticorps anti-SG33-VP7 semblent être légèrement plus élevés à J154 comparés à ceux du J54.

Les moutons immunisés avec SG33-VP7 en présence de GM-CSF, développe une réponse anticorps contre le SG33-VP7, cette production est moindre chez les moutons immunisés avec du SG33-VP7 adjuvé avec de l'IFN $\alpha$ . Une réponse anticorps dirigée contre la protéine VP7 a aussi pu être détectée à J54 et J154, elle semble plus importante chez les animaux immunisés avec le SG33-VP7 non adjuvé (**Figure 21**) que celle observée après une immunisation avec le SG33-VP7 adjuvé avec du GM-CSF ou de l'IFN $\alpha$ . Du fait de la grande hétérogénéité des réponses anticorps à la fois contre le SG33-VP7 et la protéine VP7, il nous est difficile de conclure à un effet significatif des adjuvants GM-CSF et IFN $\alpha$ . Par ailleurs une analyse statistique (Mann-Whitney) montre qu'aucune différence significative n'a été observée entre les animaux vaccinés avec le SG33-VP7 non adjuvé et les animaux vaccinés avec les SG33-VP7 adjuvés.

L'étude de réponse anticorps spécifique du MYXV ou du BTV après immunisation à J154 a été testée par séroneutralisation vis-à-vis du MYXV et du BTV-2 atténué, et a montré qu'aucun animal ne développait d'anticorps neutralisants que ce soit vis-à-vis du MYXV ou du BTV-2 atténué (**Tableau 7**).



**Figure 20.** Réponse anticorps anti-SG33-VP7 de tous les moutons aux temps J0, J24, J54 et J154 après la première immunisation. Les chiffres 1, 2, 3 et 4 représentent individuellement les 4 moutons de chaque groupe. Les tirets représentent le titre moyen des 4 moutons d'un même groupe à un temps donné.



**Figure 21.** Réponse anticorps anti-VP7 de tous les moutons aux temps J54 et J154 après la première immunisation. Les chiffres 1, 2, 3 4 représentent individuellement les 4 moutons de chaque groupe. Les tirets représentent le titre moyen des 4 moutons d'un même groupe à un temps donné

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

**Tableau 7.** Récapitulatif de l'essai vaccinal avec le vecteur SG33-VP7 avant inoculation d'épreuve. ++++ : réponse très positive, +++ réponse observée, ++, réponse faiblement positive, +/- indéterminé, -, négatif. Les moutons qui sont considérés comme meilleurs répondeurs, ont été sélectionnés pour participer à l'épreuve virulente et apparaissent encadrés en rouge.

### 3.2. Etudes de protection sur les mouton éprouvés avec du BTV-8

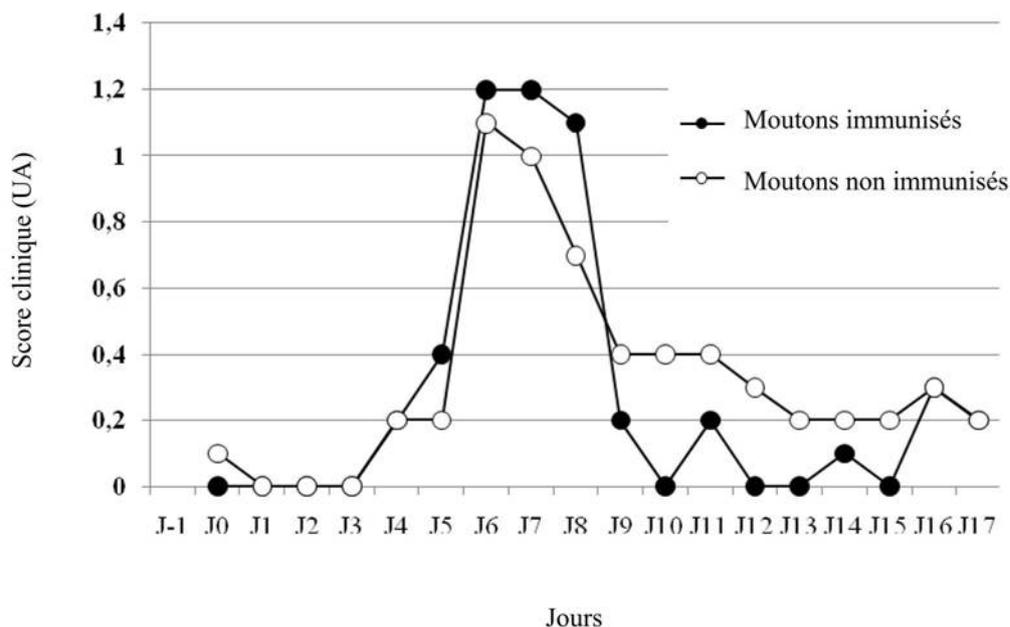
Comme nous l'avons montré précédemment, la présence d'adjuvant qu'il soit du GM-CSF ou de l'IFN $\alpha$ , n'a aucun effet significatif sur l'immunogénicité du recombinant SG33-VP7. C'est pourquoi, pour tester le pouvoir protecteur du recombinant SG33-VP7 contre une inoculation d'épreuve virulente, nous avons choisi d'inoculer neuf moutons, parmi lesquels quatre animaux non immunisés et les cinq meilleurs répondeurs, en terme de réponse cellulaire et/ou de réponse humorale. Dix mois après la première immunisation et 220 jours après la dernière immunisation ces neuf moutons ont été inoculés avec la souche W1B2 du BTV-8. La protection clinique et virologique a été suivie durant 17 jours après l'inoculation d'épreuve.

#### 3.2.1. Protection clinique

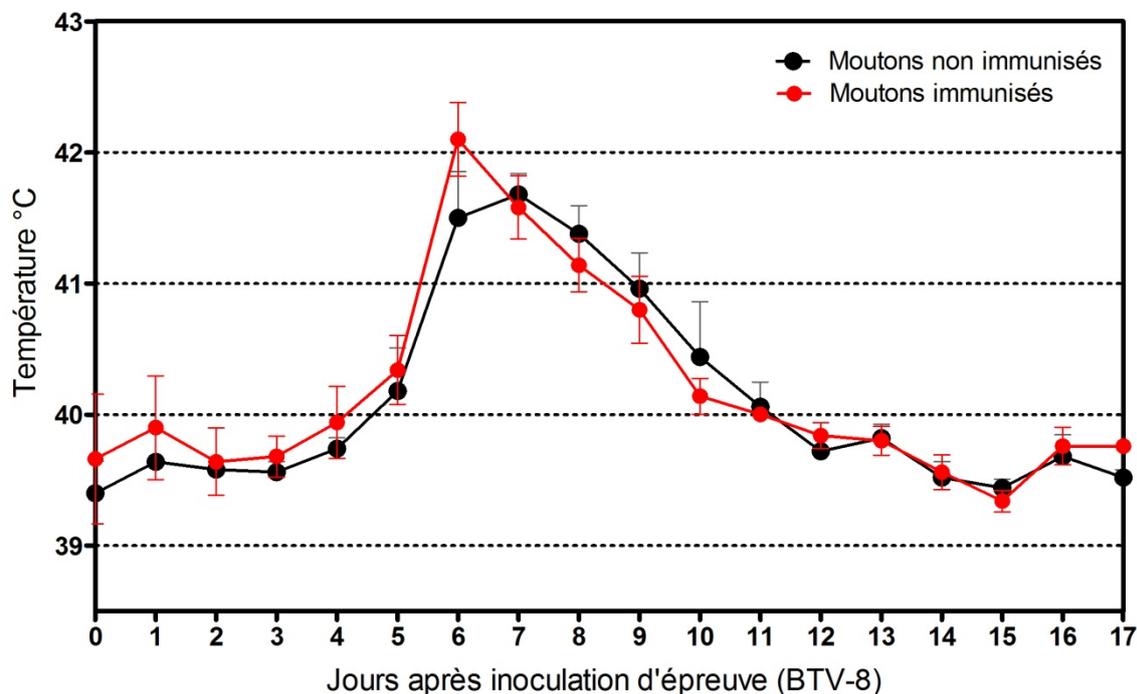
Pour les groupes d'animaux immunisés et non immunisés, la température rectale moyenne augmente à partir de J3 jusqu'à atteindre un pic à J6 (42°C), puis elle diminue pour atteindre des valeurs physiologiques après J15 (**Figure 22**). On observe que le profil d'évolution de la moyenne des températures de chacun des deux groupes est similaire.

Aucune différence significative n'est observée entre le groupe non immunisé et le groupe immunisé (ANOVA,  $p>0.05$ ). De même que la température rectale, le profil des courbes de score clinique entre les groupes non immunisés et immunisés est identique et caractérisé par une augmentation entre le J5 et J8 (**Figure 23**). Là encore, l'analyse statistique ne montre aucune différence significative (ANOVA,  $p>0.05$ ). Le modèle d'épreuve s'est avéré modérément virulent, comme en témoigne la valeur des scores cliniques.

Ces résultats montrent que l'immunisation des moutons par le SG33-VP7 n'induit pas une protection clinique contre une infection par le BTV-8.



**Figure 22.** Suivi du score clinique des moutons après inoculation d'épreuve par le BTV-8. L'évolution de la moyenne des scores cliniques des animaux non immunisés ou immunisés avec SG33-VP7, est représentée.



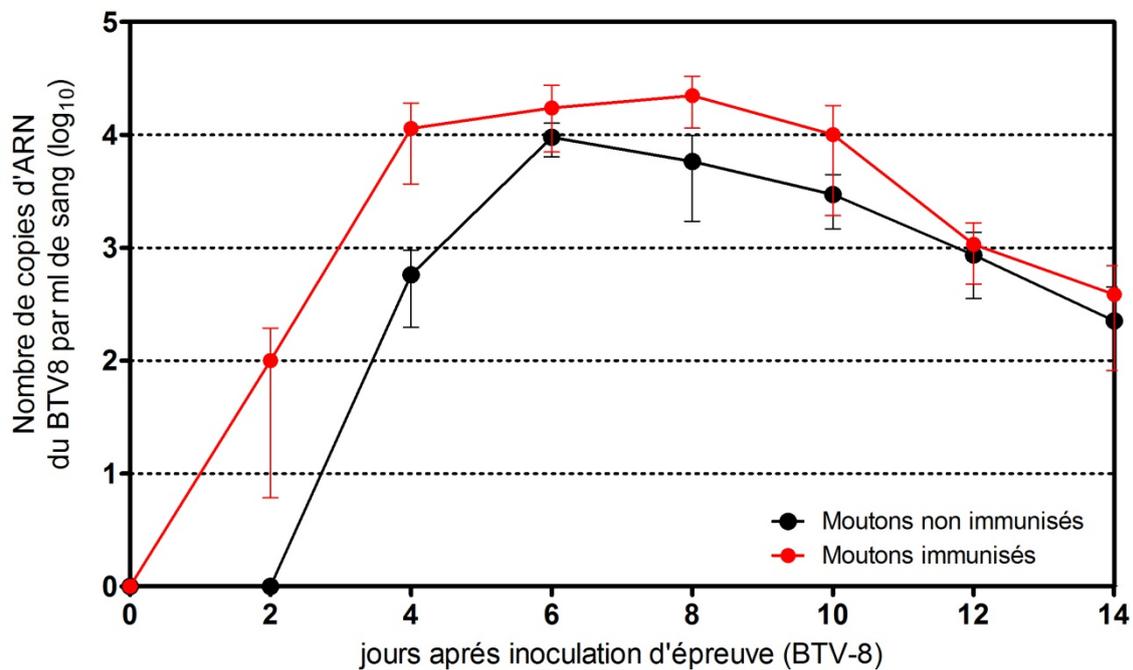
**Figure 23.** Suivi de la température rectale des moutons après inoculation d'épreuve par le BTV-8. Les variations des moyennes des températures des animaux non immunisés ou immunisés avec SG33-VP7, sont représentées.

### 3.2.2. Protection virologique

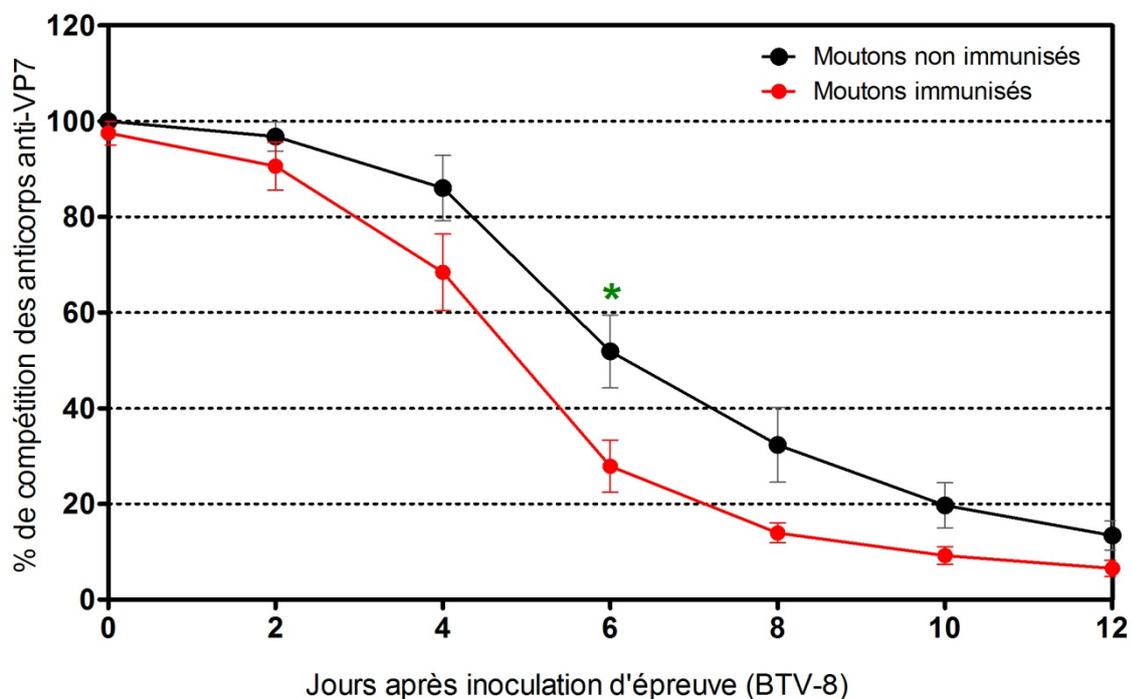
Les ARN du BTV-8 ont été détectés en grande quantité dans le sang des moutons de J2 à J8 pour le groupe SG33-VP7 et de J4 à J8 pour le groupe contrôle. Les cinétiques et les charges virales sont similaires entre les deux groupes avec un maximum ( $> 4 \log_{10}$  copies d'ARN du BTV par mL de sang), à J6 et J8 post-infection pour les animaux non immunisés et immunisés, respectivement (**Figure 24**). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. L'immunisation des moutons par le SG33-VP7 n'induit pas de protection virologique contre une infection par le BTV-8.

### 3.3. Réponse immune induite après l'inoculation d'épreuve

La réponse anticorps anti-VP7 a été étudiée après inoculation d'épreuve, à l'aide d'un ELISA commercial de compétition. Sur la **figure 25**, la réponse humorale anti-VP7 se développe plus rapidement chez les animaux immunisés que chez les animaux non immunisés, suggérant que la présence d'une réponse immunitaire mémoire a permis un développement plus rapide de la réponse anticorps suite à l'inoculation d'épreuves. A J6, le pourcentage moyen de compétition entre les groupes immunisés et non immunisés est significativement différent (ANOVA,  $p < 0.05$ ).



**Figure 24.** Virémie des moutons après inoculation d'épreuve. La virémie a été mesurée quotidiennement de J0 à J8 sur les dix moutons.



**Figure 25.** Réponse anticorps anti-VP7 après l'inoculation d'épreuve (ANOVA,  $p < 0.05$  (\*))

#### 4. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que les animaux immunisés avec le recombinant SG33-VP7 étaient capables de développer d'une part une réponse immune cellulaire LT CD4<sup>+</sup> et d'autre part une réponse humorale aussi bien contre le vecteur que contre le transgène. Par contre suite aux immunisations, aucun anticorps neutralisant le BTV ou le MYXV n'a été produit. La réponse cellulaire et humorale induite s'est avérée insuffisante pour conférer une protection clinique et virologique suite à une épreuve virulente hétérologue. Cependant suite à l'inoculation d'épreuve, une réponse humorale anti-VP7 s'est développée plus rapidement chez les animaux immunisés par rapport aux animaux non immunisés, suggérant que le vecteur est suffisamment immunogène pour induire la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire, qui persiste dans le temps. Cette réponse mémoire est certainement liée à la forte réponse LT CD4<sup>+</sup> ou à la présence de LB mémoires chez les animaux que l'on a choisis. Même si l'immunisation des animaux par le recombinant SG33-VP7, n'a pas induit de protection virologique et clinique contre une inoculation d'épreuve virulente, les résultats obtenus ont confirmé que le MYXV est immunogène et sûr d'emploi puisque là encore aucun effet secondaire, ni aucune réaction au niveau du site d'injection n'ont été observés. Néanmoins des études complémentaires sont nécessaires pour améliorer la vaccination avec ce vecteur. En effet au cours de l'étude, la réponse immune générée par le recombinant SG33-VP7 était très hétérogène chez les animaux au sein d'un même groupe. Cette hétérogénéité est vraisemblablement due à une variabilité de la réceptivité entre les animaux et pourrait être corrigée par une augmentation de la dose vaccinale. Boone et al, 2007, ont montré que l'immunisation d'animaux avec  $6,3 \cdot 10^8$  UFP de CNPV-BTV a permis la protection de la maladie contre une souche de BTV. La quantité que nous avons utilisée dans notre étude ( $2 \cdot 10^7$  UFP) est proche de celle utilisée par Wade-Evans ( $1,5 \cdot 10^7$  UFP), à la différence que dans son étude, il s'agissait d'un vecteur répliquatif. Cela signifie que la quantité de protéines

recombinantes exprimée par le MYXV dans ces conditions est inférieure à celles des deux autres essais.

Par ailleurs, malgré le fait que le SG33-VP7 en présence de GM-CSF soit capable d'induire une réponse cellulaire et humorale relativement plus élevée, il semblerait que dans notre contexte, l'utilisation d'adjuvant GM-CSF ou IFN $\alpha$ , n'ait pas d'effet significatif sur l'immunogénicité du MYXV. Lorsque des cellules dendritiques sont infectées par le MYXV, les voies de signalisation des IFN de type I sont très fortement activées, suggérant que le virus induit une forte production d'IFN de type I. Ainsi l'ajout d'IFN $\alpha$  n'est sans doute pas utile dans un contexte où les voies mobilisées par cette cytokine sont déjà très fortement induites. L'étude réalisée par Reali et al, 2005, a montré que l'administration sous-cutanée de GM-CSF intégré dans un *Fowlpox virus* (FWPV) non répliquatif à des souris, stimule la maturation et la prolifération des CPA et amplifie donc la réponse immunitaire de l'hôte. Cette action du GM-CSF est d'autant meilleure lorsque le gène codant pour cette cytokine est intégrée dans le vecteur. Ainsi dans notre cas, il faudrait sans doute envisager d'intégrer ces cytokines dans le vecteur lui-même afin d'avoir des résultats plus concluants, mais aussi se tourner vers d'autres types d'adjuvants, comme le Carbopol ou l'adjuvant incomplet de Freund qui ont été utilisés avec succès dans plusieurs vaccinations (89, 280).

Par rapport à l'étude de Wade-Evans et al. en 1996, une réponse humorale non neutralisante et une réponse cellulaire ont été détectées dans notre étude. Mais aucune protection contre la maladie n'a été observée, alors que le vecteur que nous avons utilisé a déjà fait ses preuves dans les expériences précédentes. Plus récemment, d'autres équipes ont réalisé des expériences en faisant exprimer la protéine VP7 par un *Capripoxvirus* (vecteur répliquatif chez les ovins) ou un Adénovirus et n'ont obtenu aucune protection. Les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux de l'étude de Lobato en 1997, au cours de laquelle, la protéine VP7 produite par un virus recombiné VACV s'est révélée peu immunogène chez le mouton

(346). Il semble donc que l'absence de protection soit en partie liée au choix de la protéine VP7. Les résultats de Wade-Evans semblent être isolés et les observations plus récentes contredisent leurs conclusions (346). L'inefficacité de la protéine VP7 en tant qu'antigène vaccinal peut s'expliquer par plusieurs points. En premier lieu, il est connu que VP7 n'induit pas de réponse en anticorps neutralisants (148). Par ailleurs, il n'existe aucune démonstration de l'activité des anticorps anti-VP7 dans des mécanismes de protection antivirale, tels que l'ADCC.

Dans la structure du virion, VP7 s'associe en trimère et avec VP3. Il est possible que cette structure conformationnelle soit importante pour induire une réponse immunitaire efficace. Ainsi, afin d'optimiser les antigènes du BTV, il serait intéressant d'envisager la génération d'un recombinant MYXV exprimant les protéines VP3 et VP7 de capsid interne.



# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**



Dans le but de réunir à la fois sûreté d'emploi et efficacité protectrice, les stratégies vaccinales basées sur l'utilisation de poxvirus recombinés ont beaucoup évolué pendant ces dernières années. De nouvelles pistes ont donc été explorées chez les mammifères, notamment l'élaboration de souches du virus de la vaccine ayant perdu leurs capacités répliquatives (NYVAC, MVA) ou bien l'utilisation de poxvirus aviaires non répliquatifs. Ainsi des vaccins recombinés, issus de canaripoxvirus sont commercialisés en médecine vétérinaire (vaccination contre la grippe équine ou la leucose féline) (253, 326).

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse, qui a consisté à évaluer les conditions nécessaires au développement du MYXV en tant que vecteur vaccinal non répliquatif chez les ruminants. Ces travaux prospectifs ont été appliqués à la vaccination contre la FCO, une maladie virale parmi les plus sévères dans l'espèce ovine. Plusieurs vaccins de types atténués ou inactivés sont disponibles mais ils sont spécifiques d'un sérotype donné. Ils sont utilisés sous forme monovalente ou multivalente selon le contexte épidémiologique de la zone à vacciner. L'utilisation de vaccins multivalents peut être problématique puisque la réponse immunitaire varie en fonction du sérotype présent dans la préparation vaccinale (342). A ce jour leur utilisation ne permet pas de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés (stratégie DIVA). C'est pourquoi de nouvelles stratégies vaccinales comme les vaccins à base de VLP ou à base de poxvirus recombinés font actuellement l'objet de recherches. L'utilisation d'un poxvirus en tant que vecteur vaccinal a été évaluée avec plus ou moins de succès sur des animaux éprouvés par le BTV. C'est le cas du virus de la vaccine, du capripoxvirus et du canaripoxvirus (30, 197, 262, 346). Cependant les capripoxvirus ne peuvent être utilisés dans les pays indemnes de capripoxviroses comme les pays de l'UE, et le virus de la vaccine, quant à lui, présente une pathogénicité résiduelle non négligeable. C'est pourquoi, l'idée de tester le potentiel du MYXV en tant que vecteur vaccinal chez une espèce non hôte s'est imposée. Nous avons donc envisagé d'utiliser la souche SG33 atténuée du

MYXV, qui a perdu plusieurs facteurs de pathogénicité. En outre le MYXV a déjà fait ses preuves lors de la vaccination contre la calcivirose féline (216, 217). Par ailleurs, si plusieurs vecteurs poxviraux étaient disponibles, cela permettrait d'envisager de nouveaux protocoles tels que la technique du "prime-boost" (142, 212) qui consiste à utiliser des vecteurs vaccinaux différents entre la primovaccination et les rappels ultérieurs.

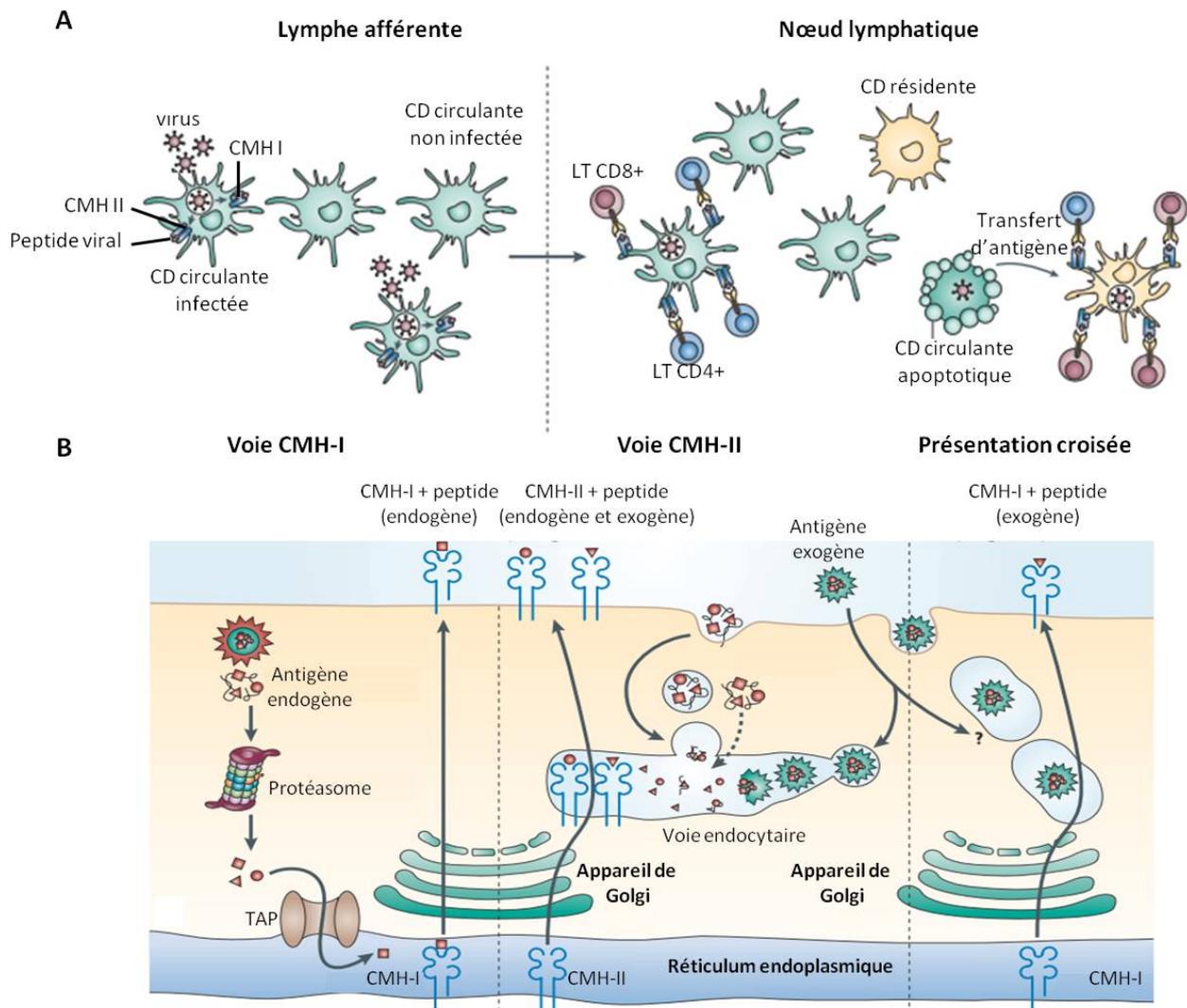
### **Interactions MYXV/ DC**

Nous avons décidé dans un premier temps de continuer l'exploration des interactions entre le MYXV et les cellules de ruminants en nous focalisant sur les DC ovines, ces cellules étant considérées comme les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Nous avons montré que le MYXV est capable d'infecter les DC d'origine ovine et d'y exprimer un transgène, tout en réalisant un cycle abortif. L'infection par le MYXV n'entraîne qu'une très faible maturation des DC ovines. L'effet des poxvirus sur la maturation des DC et leur capacité ou non à activer les lymphocytes T, reste sujet de controverses (83, 178, 195, 298, 358). Dans notre étude, nous avons montré que, malgré la faible maturation induite par le MYXV, les DC infectées sont capables de présenter l'antigène aux LT de façon efficace, puisqu'une réponse immune spécifique du transgène a été observée *in vitro* mais aussi chez l'animal, avec le développement d'une forte réponse anticorps. Nous avons aussi montré que le MYXV infecte préférentiellement les DC de type Langerhans et induit leur mort par apoptose. Les corps apoptotiques qui en résultent pourraient être phagocytés par les cellules non infectées et présentés (par présentation croisée) aux LT. Ce phénomène a déjà été démontré *in vitro* (79), suggérant que l'apoptose pourrait jouer un rôle important dans la mise en place d'une réponse immunitaire. Dans notre étude, une fraction des DC (non infectées et infectées) est encore vivante 16 heures après l'infection. On peut donc supposer que ces DC, après avoir quitté les tissus, vont gagner le nœud lymphatique drainant, à différents stades de

l'infection, certaines encore vivantes et d'autres en train de mourir par apoptose. Les corps apoptotiques dans le nœud lymphatique seraient alors pris en charge par les DC résidentes (**Figure 26**) qui pourraient alors présenter les épitopes du transgène aux LT (présentation croisée), entraînant ainsi leur activation et la mise en place de la réponse adaptative. Cette présentation croisée favoriserait plutôt l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, via une réponse de type Th1. Cette hypothèse serait en concordance avec les résultats obtenus lors de l'analyse du profil d'expression génique des DC en réponse à une infection par le MYXV.

En effet, l'apparition de nouvelles technologies, comme l'étude du profil d'expression des gènes, a permis d'explorer plus en détails les mécanismes impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire, et notamment les modifications de l'expression des gènes des cellules dendritiques à la suite du contact avec un agent pathogène. C'est ainsi qu'en 2007, Guerra et al, ont comparé le profil d'expression génique des cellules dendritiques suite à une infection par MVA ou NYVAC. Cette analyse a été effectuée 6 heures après infection à cause de l'effet cytopathique des poxvirus, qui est associé à une dégradation des ARN et l'induction de l'apoptose des cellules dendritiques à des temps plus tardifs. L'analyse du profil d'expression génique des cellules dendritiques infectées par le MVA ou le NYVAC, a mis en évidence 544 gènes distincts dont 195 sont communs aux deux virus. L'infection par le MVA, induit l'expression de 359 gènes alors que celle avec NYVAC ne modifie l'expression que de 165 gènes, parmi lesquels, on retrouve IL-12 $\beta$ , IFN $\beta$ , TNF $\alpha$  (plus élevé pour MVA), NF $\kappa$ B. Seule l'infection par le MVA induit l'expression de OASL, MDA5, IRIG-1, IFN de type I, IL-6 et la surexpression de la voie de signalisation des TLR (134).



**Figure 26.** (A) Scénario possible du rôle des cellules circulantes et résidentes dans la présentation des antigènes aux LT suite à une infection par le MYXV (adapté de Villadangos, nature, 2007(345)). Les cellules dendritiques types Langerhans peuvent être infectées au niveau du derme par le MYXV, elles vont migrer vers les nœuds lymphatiques, où une partie d'entre elles va mourir par apoptose. Il en résulte la formation de corps apoptotiques qui vont être pris en charge par les DC résidentes CD8+, après transfert de l'antigène des cellules circulantes mortes par apoptose. Les DC résidentes vont ensuite présenter les antigènes exogènes soit au LT CD4<sup>+</sup> soit au LT CD8<sup>+</sup> par présentation croisée et induire ainsi leur activation. (B) Les voies de présentation antigénique des cellules dendritiques. Toutes les DC ont les voies de présentation antigénique par le CMH de classe I (protéines endogènes) ou CMH de classe II (protéines exogènes et endogènes) fonctionnelles. Les DC CD8<sup>+</sup> ont la capacité de présenter des antigènes exogènes par les molécules de CMH de classe I (présentation croisée), bien que les mécanismes impliqués dans cette voie soient encore mal compris

Dans notre étude, l'analyse transcriptomique des DC montre que l'infection par le MYXV induit la transcription de gènes et de cytokines pro-inflammatoires impliqués dans les fonctions majeures des DC, comme la mise en place d'une réponse antivirale (réponse IFN de type I), la communication entre les cellules de l'immunité innée et adaptative, et la polarisation de la réponse immune adaptative vers une réponse de type Th1.

La comparaison du profil d'expression génique induit par le MYXV avec les profils induits par les autres poxvirus ou par un vaccin à virus atténué contre la fièvre jaune (YF17D), indique que certains gènes régulés sont communs ; il s'agit notamment des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la réponse IFN de type I (233). Le vaccin YF17D a été démontré comme l'un des vaccins les plus efficaces chez l'homme. Cette signature transcriptomique, si elle est étendue à d'autres vaccins pourrait s'avérer être un outil précieux pour évaluer l'efficacité de nouveaux candidats vaccins. En effet, une pré-évaluation des ces candidats vaccins, permettrait de faire une pré-sélection, réduisant ainsi les expérimentations d'immunisation et de protection qui sont en général très longues, lourdes à conduire et très coûteuses.

### **Evaluation du pouvoir protecteur des recombinants MYXV chez des animaux éprouvés par le BTV**

Les données obtenues suite à l'étude de l'interaction entre le MYXV et les DC, nous ont confortés dans l'idée d'utiliser le MYXV comme vecteur pour l'immunisation des ruminants. Afin de valider notre système, il nous restait à établir *in vivo* la preuve de concept du pouvoir protecteur d'un candidat vaccin MYXV contre une maladie majeure. Nous avons choisi la FCO pour les raisons déjà évoquées, à travers deux études de protection, l'une contre une épreuve virulente homologe et l'autre hétérologue.

Dans le premier essai de protection, nous avons construit des recombinants MYXV exprimant la protéine VP2 du BTV-8 seule (SG33-VP2) ou en association avec la protéine VP5 du même sérotype (SG33-VP2/5). Nous avons montré que deux immunisations avec le SG33-VP2 ont permis d'induire la production d'anticorps neutralisants et de protéger cliniquement les moutons contre une inoculation d'épreuve BTV-8. Cette protection était toutefois plus faible que celle obtenue chez les moutons vaccinés avec le vaccin inactivé Alsap8. Par ailleurs, de façon surprenante, l'immunisation des moutons avec le recombinant SG33-VP2/5, n'a pas induit de protection contre une épreuve virulente de sérotype homologue. Le deuxième essai de protection a été réalisé avec un recombinant exprimant la protéine VP7 du BTV-2, seul ou adjuvé avec du GM-CSF ou de l'IFN- $\alpha$ , contre une inoculation d'épreuve de sérotype hétérologue (BTV-8). Le vecteur SG33-VP7 a induit une réponse en anticorps non neutralisants après deux immunisations successives et une réponse cellulaire CD4. Cependant cette réponse immunitaire ne s'est pas révélée protectrice. Par ailleurs aucune différence n'a été observée entre les groupes immunisés avec ou sans les adjuvants, suggérant que les adjuvants n'ont pas eu d'effet sur la réponse immune.

D'autres études de protection contre la FCO, utilisant d'autres poxvirus ou des baculovirus pour exprimer l'antigène, avaient déjà été publiées. Comme nous l'avons précédemment discuté, la comparaison avec ces études est difficile, tant elles diffèrent les unes des autres par le protocole d'immunisation, la dose d'antigène injectée, la nature des antigènes du BTV, le mode d'administration de l'antigène, la construction des poxvirus ainsi que la souche de BTV utilisée lors de l'inoculation d'épreuve. Nous avons toutefois choisi de discuter certains facteurs qui, à notre avis, influencent soit le degré de protection soit l'interprétation des résultats.

- *Le choix des antigènes utilisés*

Le choix des antigènes à sélectionner reposait principalement sur les données de la littérature. La protéine VP2 porte à la fois des épitopes majeurs responsables de la réponse neutralisante protectrice et des déterminants immunogènes majeurs des CTL et des LT helper. De plus, il a été montré que la présence de VP5 semblait augmenter la réponse en anticorps neutralisants, induite par la protéine VP2, probablement en favorisant la reconnaissance conformationnelle des épitopes de VP2 (30, 197, 280). Dans la mesure où VP2 induit une réponse immunitaire spécifique du sérotype, nous avons aussi choisi de travailler avec la protéine VP7, qui est relativement conservée entre les groupes et susceptible d'offrir une protection hétérologue.

L'intervention de l'immunité cellulaire est encore mal connue alors que son rôle semble être primordial dans la protection homologue voire hétérologue (260, 346). NS1 et VP2 sont les plus fréquemment reconnues par les CTL (158), alors que VP7, VP5 ou encore NS3 le sont peu voire pas du tout (9). Par ailleurs, Pearson et Roy (1993), ont montré que des moutons immunisés avec des CLP contenant uniquement les protéines VP7 et VP3 du BTV-10 étaient partiellement protégés contre une inoculation d'épreuve homologue (BTV-10), mais aussi contre une inoculation d'épreuve hétérologue (BTV-2, -4, -11, -20 et -23), et ce sans présence d'anticorps neutralisants. De plus des souris immunisées avec ces mêmes CLP, développaient des CTL capables de lyser les cellules infectées par un recombinant exprimant les protéines VP7 et VP3 (260). Sur la base de ces études, il serait intéressant d'envisager la génération de recombinants MYXV exprimant les protéines de capsid interne VP3 et VP7, mais aussi NS1. En fait, un recombinant SG33-NS1 a été construit au laboratoire mais nous n'avons jamais pu valider son expression protéique. Les seules données de la littérature sur l'utilisation conjointe de poxvirus exprimant plus de deux antigènes proviennent de l'étude de Perrin et al. (2007). L'utilisation conjointe de capripoxvirus exprimant les protéines NS1, VP2, VP7 et NS3 du

BTV-2 a permis une immunisation partiellement protectrice lors d'une inoculation d'épreuve homologe. Toutefois il n'y avait pas dans cette étude de comparaison avec une utilisation individuelle des vecteurs, permettant d'évaluer le gain d'une vaccination multi-antigénique. Outre le choix des antigènes, se posait la question de l'utilisation simultanée de plusieurs antigènes par le même MYXV. Nous avons fait le choix de nous concentrer dans un premier temps sur un MYXV exprimant VP2 et VP5, pour les raisons déjà énumérées. Dans notre étude, les résultats obtenus avec le SG33-VP2 sont meilleurs que ceux obtenus avec le SG33-VP2/5. Ces résultats confirment ceux présentés avec le VACV par Lobato et al (1997). Nous ne pouvons cependant infirmer le rôle de VP5 dans la réponse en anticorps neutralisants car nos deux recombinants n'expriment pas la même quantité de VP2. Par ailleurs, nous avons montré que VP5 était majoritairement nucléaire alors VP2 était exclusivement cytoplasmique après infection de RK13 avec les vecteurs recombinants SG33-VP2, SG33-VP5 et SG33-VP2/5. L'absence d'interaction possible entre VP2 et VP5 pourrait expliquer la moindre efficacité du SG33-VP2/5. Il est à regretter l'absence d'information sur la co-localisation des protéines VP2 et VP5 produites par ces poxvirus.

- ***Le niveau d'expression de l'antigène nécessaire pour stimuler une réponse immunitaire***

L'amplitude de la réponse immune dépend de la dose d'antigènes administrée. Au dessous d'un certain seuil, les protéines sont incapables d'induire une réponse immunitaire. Au dessus, l'augmentation graduelle de la réponse est proportionnelle à l'augmentation de la dose d'antigènes jusqu'à atteindre un plateau, s'en suit une diminution lorsque les doses d'antigène deviennent trop élevées. En effet lorsque les doses sont trop élevées, la réponse immune peut être inhibée (159). Nos résultats suggèrent, qu'au-delà d'une charge virale utilisée, il est primordial de pouvoir quantifier l'expression du transgène *in vivo*, ou à défaut *in vitro*, avant

de poser toute affirmation sur la validité ou non de l'utilisation d'un antigène. Lors de notre étude avec les vecteurs SG33-VP2 et SG33VP2/5, nous sommes partis sur des doses d'inoculation de  $6.3 \times 10^8$  UFP par animal car ces doses avaient été utilisées avec succès par Boone et al. (2007) avec le vecteur non répliatif canarypoxvirus. Toutefois nous n'avons pas de valeurs comparatives sur le niveau d'expression de l'antigène entre ces deux vecteurs *in vitro* et à fortiori *in vivo*. De même l'absence de protection induite par le SG33-VP7 pourrait s'expliquer en partie par la quantité de virus administrée ( $2 \times 10^7$  UFP/animal) et conséquemment la dose d'antigène inoculée. Toutefois la charge virale administrée n'est en rien garante de la quantité de VP7 produite *in vivo*, même si les données *in vitro* ont montré que le SG33-VP7 exprimait très fortement VP7 en cellules RK13 (données non montrées).

Dans ce travail nous avons essayé de quantifier le niveau d'expression des protéines produites par nos deux vecteurs SG33-VP2 et SG33-VP2/5. Ces données ne sont malheureusement pas disponibles pour les autres poxvirus utilisés, ce qui empêche toute comparaison. De notre étude, il ressort que le niveau d'expression de VP2 est potentiellement responsable des différences d'efficacité observées entre les vecteurs SG33-VP2 et SG33-VP2/5. Nous n'avons cependant pas quantifié l'expression différentielle de VP2 *in vivo* après inoculation des 2 vecteurs. Toutefois Roy et al (1990) ont montré qu'une différence d'un facteur 2 dans la quantité de VP2 inoculée à des moutons était déterminante dans l'induction d'une protection contre une épreuve virulente de BTV chez des moutons. Ainsi peut-on émettre l'hypothèse que dans notre système, le niveau d'expression de VP2 produite par SG33-VP2 est à un niveau minimal pour induire une réponse protectrice partielle, expliquant sa moindre efficacité par rapport au vaccin inactivé. A fortiori, le niveau d'expression de VP2 dans SG33-VP2/5 n'est pas suffisant pour stimuler une réponse immune protectrice. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il serait intéressant de procéder à des tests avec des titres croissants de SG33-VP2, utilisés seuls ou en association avec le recombinant SG33-

VP5, afin de déterminer la dose minimale nécessaire pour induire une protection totale contre une épreuve virulente. Le fait de combiner deux recombinants individuels, SG33-VP2 et SG33-VP5, pourrait aussi nous permettre de déterminer si l'efficacité moindre du double recombinant SG33-VP2/5 proviendrait de l'incompatibilité entre les deux gènes dans notre construction du double recombinant. Une autre solution serait d'apporter VP2 et VP5 par le même vecteur mais en insérant les gènes L2 et M5 dans deux sites intergéniques différents.

Dans l'hypothèse d'un défaut dans le niveau d'expression de l'antigène, plusieurs voies pourraient être envisagées pour optimiser l'utilisation du MYXV.

- Définir la charge virale minimale, en partant de la quantité de virus utilisée lors de la première étude. La dose de  $6.3 \times 10^8$  UFP est déjà une dose importante et augmenter la quantité de virus à injecter pourrait alors poser des problèmes techniques lors de la production du virus vaccinal.
- Augmenter le niveau d'expression des différentes protéines en jouant sur les promoteurs poxviraux. Les promoteurs entomopoxvirus 42k (précoce), du virus de la vaccine H6p (précoce-tardif) et p7.5 (précoce-tardif) ont été utilisés dans nos constructions (261, 330). Le promoteur H6p, utilisé pour l'expression de VP2 dans notre étude, semble un promoteur moins puissant que le promoteur 42k. C'est cependant le même promoteur qui a été utilisé pour exprimer la VP2 dans le canarypoxvirus (30). Il est possible que dans un contexte MYXV, la "force" de ce promoteur soit moins importante. Pour augmenter l'expression de VP2 il serait alors possible de placer le gène sous le contrôle d'un promoteur fort précoce-tardif, type p7.5, voire pIL1, qui possède une capacité d'expression dix fois plus importante que les autres promoteurs poxviraux (196). Par ailleurs nos résultats sur les interactions entre le MYXV et les cellules dendritiques ou les lymphocytes de ruminants montrent

une absence probable de transcription des gènes tardifs. Il est donc impératif d'utiliser dans nos constructions un promoteur ayant une activité forte lors de la phase précoce du cycle de réplication du MYXV.

- Mieux cibler l'immunogénicité du MYXV chez les ruminants. Outre le niveau d'expression du transgène, de nouvelles approches peuvent être envisagées pour mieux cibler l'immunogénicité induite par les vecteurs poxviraux et notamment le MYXV. L'incorporation directe d'un antigène au sein même du virion par fusion avec une protéine d'enveloppe est une approche envisageable. Kwak et al. (2004), ont montré que l'immunisation avec un virus de la vaccine recombiné contenant la protéine Gag du HIV-1, fusionnée à la protéine B5R du virus de la vaccine, a permis une protection partielle des souris contre une souche de *Listeria* exprimant cette même protéine Gag (186). Cette stratégie a permis d'améliorer la réponse immunitaire contre l'antigène étranger comparé au virus de la vaccine recombiné standard. Dans le cas du MYXV, il a été envisagé le même processus mais avec deux protéines d'enveloppe représentatives de deux formes virales, M071L et M022L. M071L est une protéine immunodominante homologue de la protéine H3L de la vaccine, qui est présente de façon majoritaire sur l'enveloppe des IMV. M022L est une protéine homologue de la protéine F13L du virus de la vaccine, présente abondamment au niveau de l'enveloppe des EEV (86). Au sein du laboratoire deux recombinants comportant les protéines GFP ou M2e du virus influenza aviaire, fusionnées au niveau N-terminal de la protéine M022L, ont été construits. Tous les lapins immunisés avec ces deux recombinants ont développé des anticorps anti-GFP et anti-M2e respectivement. De plus, bien qu'issus de la souche sauvage T1, les virus recombinés étaient atténués chez les lapins, sans qu'il ait été observé de défaut de production virale *in vitro*. Compte tenu de ces résultats encourageants, des recombinants contenant le gène de la protéine

VP2 du BTV-8, fusionné au gène de M022L ou de M071L ont été construits. Leur évaluation est en cours. Enfin, l'utilisation de protéines de fusion pourrait permettre d'adresser plusieurs protéines recombinantes sur un même site cellulaire, comme par exemple VP2 et VP5.

- *L'importance du modèle d'épreuve*

La validation d'une inoculation d'épreuve repose en tout premier lieu sur des critères méthodologiques. Le principal est la capacité du modèle d'épreuve à reproduire dans le groupe contrôle non vacciné, la symptomatologie et la physiopathologie de la maladie telles qu'observées dans les conditions naturelles. Dans notre étude principale nous avons développé un modèle d'épreuve virulent à BTV-8, capable d'induire des signes cliniques sévères, nécessitant l'euthanasie de 2 des 5 moutons inoculés. Pour cela nous avons pris en compte différents paramètres tels que le statut des animaux, la virulence de la souche de BTV utilisée et le mode d'inoculation (68). Pour la FCO, il est communément admis que certaines races de moutons apparaissent plus sensibles que d'autres. Le choix des moutons Préalpes dans notre étude reposait sur des expériences préalables d'infection à BTV, qui avaient permis d'induire une symptomatologie significative chez les animaux contrôles. Plus que le sérotype, la virulence d'une souche dépend aussi de son topotype et probablement de sa non-atténuation par passages successifs en cultures cellulaires. Notre BTV-8 d'épreuve a été isolé à partir d'un foyer de FCO lors de l'épizootie de 2007 en Europe, qui s'est montrée particulièrement sévère (71, 355). L'inoculum a de plus subi un très faible nombre de passages en cultures cellulaires et a été réadapté à son hôte par deux passages successifs chez le mouton, avant son utilisation. Nous avons fait l'hypothèse que cette méthode de production permettrait de produire une souche particulièrement bien adaptée à son hôte. Il a en effet été décrit l'atténuation rapide du BTV par passages successifs en cultures cellulaires (115). Cette évolution du BTV pourrait

s'expliquer par la sélection rapide de génomes minoritaires moins pathogènes et maintenus à basse fréquence lors de l'infection des animaux. Plus récemment des études ont cependant montré que du BTV-8, passé à faible nombre de passages en cultures cellulaires, était capable d'induire des signes cliniques sévères de niveau comparable à un inoculum récupéré directement sur mouton infecté (68, 213). Le rôle de la voie d'inoculation sur l'efficacité d'un modèle d'épreuve semble plus controversé. Dans notre étude nous avons choisi les voies IV et SC en simultané car la voie SC avait déjà été utilisée avec succès par l'équipe et la voie IV avait récemment été utilisée dans une infection expérimentale capable d'induire des signes cliniques sévères de FCO (204). L'idée était d'augmenter la sévérité de notre modèle d'épreuve par rapport à nos études préalables, ce qui a été obtenu (données non montrées).

Si on compare nos résultats obtenus par rapport aux deux études récentes sur la vaccination poxvirale contre la FCO, le SG33-VP2 semble induire une protection intermédiaire entre celles produites par le canaripoxvirus (30) et le capripoxvirus (262). Si on compare avec l'étude de Boone utilisant le canaripoxvirus exprimant VP2 et VP5 du BTV-17, leur construction du vecteur recombinant et leur protocole d'immunisation est très proche de notre protocole mais leur inoculation d'épreuve diffère par le sérotype et le mode d'inoculation. Les moutons vaccinés étaient cliniquement et virologiquement protégés dans cette étude. Toutefois, il n'y a pas de description des signes cliniques ni d'établissement d'un score clinique sur les animaux contrôles, permettant de valider le modèle d'épreuve. Ces auteurs ont testé des moutons Mérinos, connus pour être très sensibles à la FCO. Aucune mortalité n'a cependant été observée chez les 5 moutons Mérinos du groupe contrôle, contrairement à notre modèle d'épreuve. A l'inverse Boone et al., obtiennent une protection virologique complète, ce qui n'est pas le cas avec les vecteurs SG33. Si on compare avec l'étude de Perrin et al. et l'utilisation du capripoxvirus, le modèle d'épreuve est assez proche du notre en terme d'efficacité clinique sur le groupe contrôle. La protection clinique obtenue est très partielle

avec le capripoxvirus mais là encore les comparaisons apparaissent difficiles à réaliser car les protocoles d'immunisation diffèrent largement entre les deux études.

Il en ressort finalement la nécessité de disposer, outre d'un contrôle négatif de vaccination, d'un contrôle positif commun entre les différentes études, en la présence d'un vaccin commercialisé. En ce sens, le vaccin inactivé BTV-8 que nous avons utilisé dans cette épreuve est un gold standard performant au vue des résultats obtenus.

En bilan de ce travail, les deux essais de protection ont apporté une preuve de concept de l'utilisation du MYXV comme vecteur vaccinal chez les ruminants. Si on évalue maintenant nos résultats par rapport aux objectifs d'une amélioration de la vaccination contre la FCO, trois points majeurs peuvent être discutés.

- l'efficacité du vecteur SG33 exprimant VP2, ou VP2 et VP5 doit être améliorée, au vu des résultats comparatifs avec le vaccin inactivé du commerce. Outre les points d'amélioration déjà discutés, l'utilisation d'adjuvants pourrait être envisagée. Les fortes réponses immunes adaptatives à des antigènes protéiques nécessitent souvent que l'antigène soit injecté sous forme de mélange avec un adjuvant. L'utilisation des poxvirus peut en théorie répondre à ce problème car ils sont capables de stimuler efficacement la réponse immunitaire contre les produits des transgènes. Cependant pour augmenter le niveau de ces réponses, il est possible d'envisager des recombinants MYXV, en présence d'adjuvants tels que les cytokines immunomodulatrices (GM-CSF, IFN- $\alpha$  ou Flt3L qui permettent un recrutement des cellules dendritiques au niveau du site d'inoculation (245)), le Carbopol, l'adjuvant incomplet de Freund, et l'hydroxide d'aluminium (AlOH<sub>3</sub>) (89, 280). Lors de notre deuxième étude nous n'avons pas pu montrer d'effets bénéfiques du GM-CSF et de l'IFN- $\alpha$  sur la réponse immunitaire induite par le SG33-VP7. Cette étude reste toutefois préliminaire car une seule dose de chaque adjuvant a été testée sur un nombre limité d'animaux. Nous

avons aussi fait le choix dans un premier temps d'administrer l'adjuvant sous forme protéique dans la préparation vaccinale. Il pourrait être plus judicieux d'insérer directement dans le génome du MYXV, les gènes codant les cytokines immunomodulatrices. Reali et al. (2005), ont en effet montré que l'administration sous-cutanée à des souris de GM-CSF intégré dans un *Fowlpox virus* (FWPV) non répliquatif, stimule la maturation, la prolifération des CPA et amplifie la réponse immunitaire de l'hôte, de façon plus efficace que lorsqu'il est administré dans la solution vaccinale en tant qu'adjuvant.

- l'utilisation du vecteur SG33 a confirmé la possibilité de faire une distinction entre animaux vaccinés et infectés dans une stratégie de type DIVA. En effet dans notre première étude, tous les moutons vaccinés SG33-VP2 et SG33-VP2/5 étaient bien séronégatifs en anticorps anti-VP7, comme le confirme le test ELISA commercial réalisé. Tous ces animaux ont séroconverti en anticorps anti-VP7 après inoculation d'épreuve.
- par rapport à une vaccination contre plusieurs sérotypes, nous n'avons à ce stade que des pistes d'orientation. La réponse neutralisante est dirigée contre des épitopes conformationnels de VP2, qui sont spécifiques de sérotype. Compte tenu de la nature conformationnelle des épitopes, de l'absence d'identification de leurs séquences amino-acide et de l'extrême diversité de la séquence d'acides aminés de VP2 des différents sérotypes du BTV, la création d'une gène multiépitopique comprenant les épitopes majeurs de différents sérotypes s'avère hasardeuse. On pourrait aussi concevoir l'insertion des gènes codant VP2 de plusieurs sérotypes dans un même vecteur SG33. Dans la mesure où il existe des réactions croisées entre certains sérotypes, on pourrait envisager de cloner quatre à cinq gènes VP2 représentant les sérotypes majeurs dans un même vecteur SG33. Enfin, dans la mesure où la réponse

immune cellulaire participe à la protection multisérotypique partielle, il serait intéressant de pouvoir stimuler ce type de réponse par le MYXV. Les poxvirus sont connus pour induire une réponse immunitaire cellulaire forte. Nous avons initié l'étude de la réponse en LTh dans nos deux expériences. Toutefois, nous n'avons pas analysé la réponse en CTL et nos études restent très préliminaires.

En conclusion, ce travail de thèse a conduit à la démonstration de l'efficacité vaccinale d'un nouveau vecteur recombinant chez les ruminants, le MYXV. Le caractère prédictif de l'étude d'expression génique des DC suite à une infection par le MYXV, a été ainsi confirmé par les essais vaccinaux. Cette approche et la liste de gènes que partagent le MYXV avec les poxvirus mais surtout avec un vaccin utilisé de façon efficace chez l'homme, pourrait servir de modèle pour évaluer l'efficacité de nouveaux candidats vaccin, non seulement chez les ruminants mais aussi dans d'autres espèces et contre d'autres maladies infectieuses.

# ANNEXES



## Annexe I. Amorces ovines pour la RT-qPCR.

<i>Gene bank accession</i>	<i>Gene name</i>	5'	3'
FE030274	ADAM19	GGCTCTCCTTGTCTCAGTGG	AAGGCTAAAAAGAACCGAAGG
EE817371	BCL2L12	CCTCTCAGCCAGTTCCTTCA	GGGCACGGTAATGTTTGACT
EE784040	CASP8	GGGTATAAAGTCCCACATCCA	GGCTAAGAGAGGAGGGTCA
EE821767	CD40	GCGGAGAGAAGCAATACCC	GACCTCTGTGCAGTCGTTCA
EE865312	CEBPA	TAAACCTGTGCCTTGGAAAC	GCAGGAACCTCCAGATAAA
NM_001009191	CXCL10	TCTTTACTCCAGGGGCTTCA	TGGCTGCTTCTGTATATTTGG
EE840190	DAXX	ACGGGCAGAAGACACATACC	CTGGAGCCATAGAAGCCAAG
NP_001177319	GAPDH	TGAGGACCAGGTTGTCTCCTG	CCCCAGCATCGAAGGTAGAA
EE851120	GBP2	CCAGGCAGGAGAGACTGA	GAAGTGCATCAGCCACACC
EF078978	HPRT	TCCTCATGGACTAATTATGGACAG	CCACCCATCTCCTTCATCAC
FE029215	IFIH1	AGGGTCAGCACGAGGAATAA	CAATAGGATGGTGGGCTTTG
AY802984	IFNa	TCTGCAAGAGAAGGGACACA	CCTGCAAGTTTGTGAGAAG
AY575613	IL10	TTTCCCTGACTGCCCTCTAA	GCTCCCTGGTTCCTTCTCCT
AF173557	IL12p35	TCAAGCTCTGCATCCTTCTTC	GCTCATCATTCTGTGATGGT
AF209435	IL12p40	TGTTCAGGTCACAGGAAAGA	CTTGTGGCATGTGACTTTGG
AF149700	IL15	GAGGCTGGCATTCATGTCTT	CCAGTTTGCTTCTGTTTGG
NM_001009263	IL18	AATTGCTACAGCTTTGTGGA	CAGGTCCTCGCCATTTTCAG
FE028359	IL27	TCCATTTTGAGGGTTCCTGG	CTATGGCAACCACCAAGTTGA
NM_001009458	INHBA	GCTTCATGTGGGAAAAGTGG	TCCGAGGTCTGCTCCATAA
NM_001009751	IRF1	CTGACCCCTTTGACTCCTT	ATTCCTGCTTCTTGCACCA
EE825317	IRF3	CCCTTCACCTCGACCAGTAA	GGGACACTGAATACCAGACACA
NM_001105040	IRF7	GGCAAGTGCAAAGTCTACTGG	GAAGTCAAAGATGGGCGTGT
NM_001009735	ISG15	ACATCCTGGTGAGGAACGAC	CTTGCACACGCTCCCTTT
NM_001009753	MX1	TTCTGCAAATGGAGTGCTGT	ATTCACAAACCTTGGCAACT
NM_001078652	MX2	GCATATTCCTGGCTGCTTC	AGAGCTTGCTGTGCCTGAGT
EE769547	OAS1	CAGGTCAAACAAGCCATCAA	AACTTTGGACACCCGAACTG
EE849073	PARP14	ACTCCAGACCAGACGCAAC	AAGCGTGTAGCATCCAGTGA
EE873219	PARP9	ATGATGCTCACTCCACAGCA	GTTCTCCAAAGCAAGGTCA
NM_001100921	PPARG	CATCTTCCAGGGGTGTCAGT	ACAAAGCCGGGGATATTCTT
EE786194	RALA	CTTTGGAGCAGGCATAGGAA	CAGCTATTTTCCCGAAGTGG
AY58223	RPL19	CAACTCCGCCAGCAGAT	CCGGGAATGGACAGTCACA
NM_001104930	RTP4	GACCTTCGTGTGGAAGTCAAG	GCTGCTCCTGGTTATGGAAA
NM_001009435	S26	GTTGTGCCATTCACAGCAAG	GTCTAAATCGGGGTGGAGGT
EE813724	STAT1	CCACCGAACTTACCCAGAAA	CCCAATACAGGCACTCTGCT
EE770695	STAT2	CTGTGCATCTGCCCTCCTAC	ATGCCTCATGTCCATCCTTG
EE747932	TAP1	TACAGAAGGCTGTGGGCTCT	CCACTCTCTGGGCATTTAGG
DQ239623	THBS1	GGACTTCTCCAGATTTTC	AGCACTGGCTTGTGATGGTT
FE035310	TIFA	AGTTCACGGACTCGAACC	TCCACATCCTCAAACTGGA
FE030797	TNNI3	TGCAAAGAGGTGGACACAG	TTAGGGGCTTCGTTTCTTCA
EE854460	TNFa	CCCTTCCACCCCTTGTT	TGGCAGAGAGGATGTTGACCTT
CU638049	TNS3	GGTGGGTGAGTCCACTGTTT	CAGAGAGGAGGGTCCACAAG
CD288271	UBA7	ACCCTGGAGTCGTTGCTG	TTTCTCAGACCATCCTGCT

## Annexe II. Amorces de lapin pour la RT-qPCR.

<i>Gene bank accession</i>	<i>Gene name</i>	<b>5'</b>	<b>3'</b>
NC_013683	<i>CXCL10</i>	GCCACAATGAAAAAGGATGG	TCTTCTGCAAGCAACAGCAA
NC_013680	<i>DAXX</i>	GAGGGAATGCAAGAACCAAA	ACCCTGGAGGACAAAGGAGT
NC_013676	<i>GAPDH</i>	GTAGCATCCGTCACCCAGAC	ACCCAAATACTCGGCTTCCT
NC_013690	<i>HPRT</i>	TTCTGTTCCGGGCTGTCTTCT	AATGTTCTGGGCTCTGATGG
NC_013684	<i>IL10</i>	CAGAGACCTTTCAGGGTTGG	TCCTGCTGCTTCTGTTTCCTT
NC_013671	<i>IRF1</i>	AGCTCGTGAGAACCTGGAGA	CTTCCTCTTTTCCCCCTGAC
NC_013685	<i>IRF3</i>	GGGAAGAGTTCAGGGAAGG	GAAAGAGGCTGTGAGCGAGT
NW_003160537	<i>IRF7</i>	GCAAGGTGTACTGGGAGGTG	GGTGCTGAAGTCGAAGATGG
NW_003160366	<i>ISG15</i>	GGACTGTTGGCGTCTATGT	GGACTGGAGACTTTCGGTTTC
NW_003159681	<i>MIX1</i>	CAGATCAAGAGAACCACGA	CACGTCAATCAGGAAGAGCA
NW_003159403	<i>OAS1</i>	TCCGGTTCCTCTGCATCTAC	GCCTTGAGCTGTTTCCTGAC
NC_013670	<i>RPL19</i>	AGCCTCAATTCTTGCCTTCA	AAGTCCCAAACCCCACTCTT
NC_013686	<i>S26</i>	GCCGTCAGGAACACCTCTAA	TGAATGGCACAACTCACACA
NC_013685	<i>THBS1</i>	CATTGATGGGGATGGTAAGG	AGCTGAAATCTGTGGGTGCT
NM_001082263	<i>TNF<math>\alpha</math></i>	GAGCAGCAACTCCAGGCTAC	GAGAGAGGAAGACGGCACAC

**Annexe III.** Gènes régulés par le MYXV dans les BM-DC ovines, 8 heures post-infection  
( $FC \geq 1.5$ )

HUGO	ENSEMBL	T0_T8			
THBS1	ENSG00000137801	-12,104825	MYOT	ENSG00000120729	-2,6185892
ANGPT1	ENSG00000154188	-5,0831914	PPAP2C	ENSG00000141934	-2,5840209
DAB2	ENSG00000153071	-4,9207306	EIF2C4	ENSG00000134698	-2,5784724
CEBPA	ENSG00000245848	-4,5339756	SH3PXD2B	ENSG00000174705	-2,5666006
DLC1	ENSG00000164741	-4,373287	TSPAN14	ENSG00000108219	-2,5536437
ADORA3	ENSG00000121933	-4,339663	FMN1	ENSG00000186031	-2,54357
ADAM19	ENSG00000135074	-4,273935	RALA	ENSG00000006451	-2,5386446
SORT1	ENSG00000134243	-4,239629	SLC48A1	ENSG00000211584	-2,5062404
SLC38A9	ENSG00000177058	-4,1419744	SRD5A1	ENSG00000145545	-2,488971
OGT	ENSG00000147162	-4,07493	HSPA4	ENSG00000170606	-2,4881527
SESN3	ENSG00000149212	-4,022517	IL16	ENSG00000172349	-2,4794524
TNS3	ENSG00000136205	-3,949524	IDH3A	ENSG00000166411	-2,4395905
MRPL15	ENSG00000137547	-3,943624	TSPAN7	ENSG00000156298	-2,429529
SLC36A1	ENSG00000123643	-3,8171687	GLS	ENSG00000115419	-2,4287565
CTSC	ENSG00000109861	-3,804367	CD14	ENSG00000170458	-2,4084036
C1orf116	ENSG00000182795	-3,7557406	TBC1D20	ENSG00000125875	-2,3528717
ASPH	ENSG00000198363	-3,7407455	PTDSS1	ENSG00000156471	-2,335465
TSKU	ENSG00000182704	-3,5177042	FAM45A	ENSG00000119979	-2,3320503
ITGAM	ENSG00000169896	-3,470677	RGAG4	ENSG00000242732	-2,328735
ZFH3	ENSG00000140836	-3,4066832	TBL1XR1	ENSG00000177565	-2,306689
CDC25B	ENSG00000101224	-3,4029765	CDC42EP3	ENSG00000163171	-2,303504
ADA	ENSG00000196839	-3,3638828	AMD1	ENSG00000123505	-2,3029766
PALLD	ENSG00000129116	-3,3174713	TCEB3	ENSG0000011007	-2,297168
ENPP1	ENSG00000197594	-3,2763755	TERT	ENSG00000164362	-2,2967234
N6AMT2	ENSG00000150456	-3,271776	KANK1	ENSG00000107104	-2,296562
GPR116	ENSG00000069122	-3,2438998	GNAQ	ENSG00000156052	-2,2945724
EDN1	ENSG00000078401	-3,2329326	RRAGC	ENSG00000116954	-2,2658784
TMEM20	ENSG00000176273	-3,1944888	PDIA4	ENSG00000155660	-2,2642455
RRM2	ENSG00000171848	-3,150581	MEGF9	ENSG00000106780	-2,2641184
ADO	ENSG00000181915	-3,1262782	TMEM109	ENSG00000110108	-2,2527134
MSR1	ENSG00000038945	-3,0842679	TMED4	ENSG00000158604	-2,246437
TNFAIP8L3	ENSG00000183578	-3,0743945	MAGED2	ENSG00000102316	-2,236463
LHFPL2	ENSG00000145685	-3,06986	CANX	ENSG00000127022	-2,2253578
TP53INP1	ENSG00000164938	-3,0683599	DCPS	ENSG00000110063	-2,218266
RASAL3	ENSG00000105122	-3,063362	FAM136A	ENSG00000035141	-2,1996722
INHBA	ENSG00000122641	-3,0559092	MID1IP1	ENSG00000165175	-2,1980848
TBL2	ENSG00000106638	-3,0461254	TUBA1B	ENSG00000123416	-2,1969488
ST6GAL1	ENSG00000073849	-3,0440776	ASRGL1	ENSG00000162174	-2,1752942
PPARG	ENSG00000132170	-3,0239935	APPL2	ENSG00000136044	-2,1743515
PDGFC	ENSG00000145431	-3,0031092	SNRNP25	ENSG00000161981	-2,1721563
LYL1	ENSG00000104903	-2,9960942	PICALM	ENSG00000073921	-2,1577106
SMAD5	ENSG00000113658	-2,9777477	GSTA4	ENSG00000170899	-2,1515605
PPP1R3C	ENSG00000119938	-2,874196	RNF160	ENSG00000198862	-2,1446543
ASAH1	ENSG00000104763	-2,8619075	C1orf107	ENSG00000117597	-2,1414292
MSRB3	ENSG00000174099	-2,8578067	ALAD	ENSG00000148218	-2,1212044
CAPRIN1	ENSG00000135387	-2,8298573	MVD	ENSG00000167508	-2,1205316
MARVELD1	ENSG00000155254	-2,8245814	RHOT2	ENSG00000140983	-2,11835
DBNDD2	ENSG00000244274	-2,8128538	POLR2D	ENSG00000144231	-2,1149182
FN1	ENSG00000115414	-2,812543	SYCP3	ENSG00000139351	-2,1145709
KIAA2013	ENSG00000116685	-2,7889707	TRAF3IP3	ENSG00000009790	-2,1025555
AKR1C4	ENSG00000198610	-2,7794404	ABCG2	ENSG00000118777	-2,0948813
MRC1	ENSG00000120586	-2,7323272	CELF5	ENSG00000161082	-2,0817401
AGPAT5	ENSG00000155189	-2,715966	NUDT4	ENSG00000173598	-2,081032

ANNEXES

C11orf83	ENSG00000204922	-2,0708683	GPR65	ENSG00000140030	1,7234998
LIPA	ENSG00000107798	-2,068714	SVIL	ENSG00000197321	1,7715406
CBFB	ENSG00000067955	-2,0634782	ZDHHC17	ENSG00000186908	1,7722063
MAN1C1	ENSG00000117643	-2,0569766	PARP10	ENSG00000178685	1,794061
CTSK	ENSG00000143387	-2,052793	TRAM1	ENSG00000067167	1,8010179
CADM1	ENSG00000182985	-2,0485098	BTC	ENSG00000174808	1,8218845
RPS6KB1	ENSG00000108443	-2,0427628	C2orf68	ENSG00000168887	1,8268657
TARDBP	ENSG00000120948	-2,0414119	ANKRD12	ENSG00000101745	1,8295852
ARL8B	ENSG00000134108	-2,0378034	MED13	ENSG00000108510	1,8347397
NUTF2	ENSG00000102898	-2,0365696	WHSC1L1	ENSG00000147548	1,8513275
ZMYND8	ENSG00000101040	-2,0353696	TEC	ENSG00000135605	1,8543788
P4HB	ENSG00000185624	-2,035319	CKS2	ENSG00000123975	1,858421
CORO1C	ENSG00000110880	-2,0348594	CCS	ENSG00000173992	1,8642584
GGA2	ENSG00000103365	-2,0325046	GPR171	ENSG00000174946	1,8654718
ATP6V1B2	ENSG00000147416	-2,025693	GEMIN6	ENSG00000152147	1,8725157
RNASET2	ENSG00000026297	-2,0110743	RERE	ENSG00000142599	1,8877242
MRPL28	ENSG00000086504	-2,010977	NFKBIB	ENSG00000104825	1,8939517
AACS	ENSG00000081760	-2,00048	PPP4R2	ENSG00000163605	1,8983426
GPD2	ENSG00000115159	-1,9952009	DNAJC7	ENSG00000168259	1,8993776
MANSC1	ENSG00000111261	-1,9933172	KIN	ENSG00000151657	1,9016694
CDK2AP1	ENSG00000111328	-1,990466	C9orf119	ENSG00000175854	1,9108058
NEK6	ENSG00000119408	-1,9727685	DMXL1	ENSG00000172869	1,9109756
FGD3	ENSG00000127084	-1,9653734	DCP2	ENSG00000172795	1,9129122
RAVER2	ENSG00000162437	-1,9621267	RNF139	ENSG00000170881	1,9210193
ST3GAL4	ENSG00000110080	-1,9587909	GNE	ENSG00000159921	1,9601679
FAM129B	ENSG00000136830	-1,9537699	ARFGEF1	ENSG00000066777	1,9631382
PON2	ENSG00000105854	-1,9484347	MRPL53	ENSG00000204822	1,9645207
TUBB2B	ENSG00000137285	-1,9312935	MYOF	ENSG00000138119	1,9655384
PEPD	ENSG00000124299	-1,9230673	PIK3AP1	ENSG00000155629	1,9766542
NUDT16	ENSG00000198585	-1,8999187	VDR	ENSG00000111424	1,9938223
TUBB3	ENSG00000198211	-1,8555485	RIPK1	ENSG00000137275	2,007421
MRPL12	ENSG00000183093	-1,8345804	MAF1	ENSG00000179632	2,0129426
TUBB6	ENSG00000176014	-1,8309596	TMEM50A	ENSG00000183726	2,0301867
SLAMF1	ENSG00000117090	-1,8281904	CCRL2	ENSG00000121797	2,0410948
EPB41L1	ENSG00000088367	-1,8222001	PPP1R16B	ENSG00000101445	2,0443456
MLYCD	ENSG00000103150	-1,8221816	FLT3LG	ENSG00000090554	2,0468066
TUBB2C	ENSG00000188229	-1,8213803	HIVEP2	ENSG00000010818	2,0677671
DDOST	ENSG00000244038	-1,8141043	RSRC2	ENSG00000111011	2,0758033
ST8SIA1	ENSG00000111728	-1,7911078	RNF31	ENSG00000092098	2,0814247
WIPI1	ENSG00000070540	-1,7804538	RAB9A	ENSG00000123595	2,1037028
STOM	ENSG00000148175	-1,763204	ETNK1	ENSG00000139163	2,1085465
LGMN	ENSG00000100600	-1,7456642	ZFP36	ENSG00000128016	2,1087782
TPM1	ENSG00000140416	-1,7452528	STK38L	ENSG00000211455	2,1124582
CDIPT	ENSG00000103502	-1,7203306	ESPL1	ENSG00000135476	2,1190948
RBM38	ENSG00000132819	-1,70172	GTF2B	ENSG00000137947	2,129361
MARS	ENSG00000166986	-1,6396781	RIPK3	ENSG00000129465	2,1293693
SEMA3F	ENSG00000001617	-1,6025772	IL18	ENSG00000150782	2,1364162
MPV17L2	ENSG00000127226	-1,5919586	NKTR	ENSG00000114857	2,1420748
UNG	ENSG00000076248	-1,5886773	NCF1	ENSG00000158517	2,1428633
TSR1	ENSG00000167721	-1,5302081	PTPN1	ENSG00000196396	2,1546912
LDLRAD3	ENSG00000179241	1,5830795	MED30	ENSG00000164758	2,1584494
FAM129A	ENSG00000135842	1,6247069	SP140	ENSG00000079263	2,1627672
MARCKS	ENSG00000155130	1,6830437	SLCO1A2	ENSG00000084453	2,1701431
IL5	ENSG00000113525	1,7159733	TBC1D15	ENSG00000121749	2,171512

ANNEXES

CCNB3	ENSG00000147082	2,1742647	MPST	ENSG00000128309	2,7042804
SLC2A1	ENSG00000117394	2,1755373	FAM111B	ENSG00000189057	2,7156498
CCNDBP1	ENSG00000166946	2,1773214	DCTN6	ENSG00000104671	2,7366948
CYP27B1	ENSG00000111012	2,205285	STAM2	ENSG00000115145	2,7387898
PSME2	ENSG00000100911	2,224962	PLEKHA3	ENSG00000116095	2,7446394
MRRF	ENSG00000148187	2,2336056	DNAJC13	ENSG00000138246	2,7462494
FTSJD2	ENSG00000137200	2,256079	CARD6	ENSG00000132357	2,7557282
ARHGAP17	ENSG00000140750	2,2574983	DYSF	ENSG00000135636	2,7848485
USP9Y	ENSG00000114374	2,2639208	GSTZ1	ENSG00000100577	2,7880223
TTF2	ENSG00000116830	2,2707858	KIAA0355	ENSG00000166398	2,8032486
CYTH2	ENSG00000105443	2,2829409	NT5C3	ENSG00000122643	2,809819
RFC1	ENSG00000035928	2,2845933	CALCOCO2	ENSG00000136436	2,841949
MYC	ENSG00000136997	2,2918613	CD40	ENSG00000101017	2,8550286
THOC7	ENSG00000163634	2,2938921	CFLAR	ENSG0000003402	2,8680115
FAS	ENSG00000026103	2,3023403	TAP2	ENSG00000228582	2,8845665
MGEA5	ENSG00000198408	2,313069	UVRAG	ENSG00000198382	2,8860555
MCL1	ENSG00000143384	2,3177168	PSMA2	ENSG00000106588	2,898435
SNAP23	ENSG00000092531	2,3188007	PKNOX1	ENSG00000160199	2,9062536
USP9X	ENSG00000124486	2,3339477	UBAP1	ENSG00000165006	2,9173045
GMNN	ENSG00000112312	2,3448226	DUSP5	ENSG00000138166	2,9447668
DNAJB2	ENSG00000135924	2,3509083	DHRS3	ENSG00000162496	2,9723318
TNFSF13B	ENSG00000102524	2,3514838	ASCC3	ENSG00000112249	2,9731264
CASP8	ENSG00000064012	2,3591444	TES	ENSG00000135269	3,025903
PPFIBP1	ENSG00000110841	2,363266	CASP5	ENSG00000137757	3,0389323
H3F3B	ENSG00000132475	2,3658473	ETV3	ENSG00000117036	3,064671
ELL2	ENSG00000118985	2,3792531	ING2	ENSG00000168556	3,0668387
FAM178A	ENSG00000119906	2,3963532	GYPC	ENSG00000136732	3,075171
BCL2A1	ENSG00000140379	2,4007688	CDADC1	ENSG00000102543	3,125444
RUFY1	ENSG00000176783	2,4021955	ACADM	ENSG00000117054	3,1259866
SAV1	ENSG00000151748	2,4064229	MIA3	ENSG00000154305	3,138651
HSD17B11	ENSG00000198189	2,441104	CREB1	ENSG00000118260	3,1837401
BBS4	ENSG00000140463	2,4515138	TP53INP2	ENSG00000078804	3,2189033
KIAA1279	ENSG00000198954	2,454399	C21ORF91	ENSG00000154642	3,2876544
VAMP5	ENSG00000168899	2,459613	GABBR1	ENSG00000232632	3,30892
MORC3	ENSG00000159256	2,4607298	HSPA6	ENSG00000173110	3,3134272
STK17A	ENSG00000164543	2,4662201	AKAP2	ENSG00000241978	3,3445756
SERTAD1	ENSG00000197019	2,489188	MARCKSL1	ENSG00000175130	3,4088593
UBE2J1	ENSG00000198833	2,4919767	APOBEC3H	ENSG00000100298	3,443648
WRN	ENSG00000165392	2,5045085	TRIM34	ENSG00000239456	3,454298
ZFAND2B	ENSG00000158552	2,5229254	HIPK2	ENSG00000064393	3,5534098
LMO2	ENSG00000135363	2,534591	STX11	ENSG00000135604	3,5605762
DENND5B	ENSG00000170456	2,5365021	TERF2IP	ENSG00000166848	3,5630617
RASSF1	ENSG00000068028	2,5389476	CDC40	ENSG00000168438	3,564315
PSMB9	ENSG00000239836	2,5438397	CCDC75	ENSG00000152133	3,57107
PAPD5	ENSG00000121274	2,5520055	LMBR1	ENSG00000105983	3,5749056
IQCC	ENSG00000160051	2,5586154	MARCH5	ENSG00000198060	3,5816321
TOP1	ENSG00000198900	2,5840333	TRAFD1	ENSG00000135148	3,5857115
BCL2L12	ENSG00000126453	2,5957882	ZC3HAV1	ENSG00000105939	3,5982642
PNRC2	ENSG00000189266	2,623417	TCF4	ENSG00000196628	3,6573148
HSPH1	ENSG00000120694	2,6547434	SLC25A28	ENSG00000155287	3,7061744
ACOT11	ENSG00000162390	2,6601381	ICAM2	ENSG00000108622	3,713674
PPIL4	ENSG00000131013	2,6735134	RNF114	ENSG00000124226	3,7191832
MAD2L2	ENSG00000116670	2,6896987	C3orf38	ENSG00000179021	3,7743452
PAPD4	ENSG00000164329	2,6966808	SAT1	ENSG00000130066	3,7960975

ANNEXES

STAT1	ENSG00000115415	3,7966669	EIF2AK2	ENSG00000055332	10,505376
HSPA1B	ENSG00000232804	3,8121974	IL27	ENSG00000197272	12,499532
FAM82A2	ENSG00000137824	3,900797	BST2	ENSG00000130303	12,5307665
IFI35	ENSG00000068079	3,9214535	MX2	ENSG00000183486	13,535912
PSMF1	ENSG00000125818	3,9300168	FTSJD1	ENSG00000180917	14,284459
CNP	ENSG00000173786	3,9514663	IFIH1	ENSG00000115267	14,460508
IFI16	ENSG00000163565	3,9519453	UBA7	ENSG00000182179	19,021008
PARP9	ENSG00000138496	4,0070376	GBP2	ENSG00000162645	20,0146
CLEC2D	ENSG00000069493	4,082445	RTP4	ENSG00000136514	22,764814
SDS	ENSG00000135094	4,120404	MX1	ENSG00000157601	33,91191
MAT2B	ENSG00000038274	4,1508675	EIF4E	ENSG00000151247	36,850548
HSPA1A	ENSG00000204389	4,1542363	ISG15	ENSG00000187608	40,765465
RBBP6	ENSG00000122257	4,2095723	CXCL10	ENSG00000169245	53,182674
NAP1L5	ENSG00000177432	4,354566			
UBE2L6	ENSG00000156587	4,37435			
SP100	ENSG00000067066	4,376559			
FBXO33	ENSG00000165355	4,4099603			
EXOSC9	ENSG00000123737	4,418929			
AREG	ENSG00000109321	4,428231			
NLRX1	ENSG00000160703	4,6767616			
EAF2	ENSG00000145088	4,6950493			
IL1RN	ENSG00000136689	4,7271967			
TNF	ENSG00000228321	4,767901			
TAP1	ENSG00000168394	4,795807			
ATXN7	ENSG00000163635	4,84969			
CNOT4	ENSG00000080802	4,855399			
TRIM26	ENSG00000228881	4,919666			
USP18	ENSG00000184979	5,0750732			
VCPIP1	ENSG00000175073	5,0930605			
RICTOR	ENSG00000164327	5,1752987			
XRN2	ENSG00000088930	5,2401114			
DAXX	ENSG00000204209	5,3685727			
ATAD1	ENSG00000138138	5,3879194			
ATXN3	ENSG00000066427	5,4419556			
IRF3	ENSG00000126456	5,481782			
PTX3	ENSG00000163661	5,646346			
SP110	ENSG00000135899	5,6771927			
ATL3	ENSG00000184743	5,70579			
MOV10	ENSG00000155363	5,9222245			
PKD1	ENSG00000008710	6,0390635			
TCEAL1	ENSG00000172465	6,1515317			
IFITM1	ENSG00000185885	6,372381			
PFN1	ENSG00000108518	6,4791203			
EPST11	ENSG00000133106	6,8992085			
CPT1A	ENSG00000110090	6,9177976			
TRIM6	ENSG00000121236	6,9316273			
COX7A1	ENSG00000161281	7,2233644			
PNPT1	ENSG00000138035	7,2327113			
TIFA	ENSG00000145365	7,314328			
NAMPT	ENSG00000105835	7,381012			
IRF1	ENSG00000125347	7,4908304			
PARP14	ENSG00000173193	7,859023			
XAF1	ENSG00000132530	8,42086			
OAS1	ENSG00000089127	9,321351			

## Annexe IV. Fonctions des gènes en commun, des DC infectées par le MYXV et ALVAC

GO term Name	GO term Id	Genes Ratio	GO term p-value (corrected)	Gene Symbols
response to virus	GO:0009615	7%	5.36789160896885e-08	EIF2AK2 ; IFIH1 ; ISG15 ; MX1 ; MX2 ; STAT1 ;
innate immune response	GO:0045087	1%	0.000185785772702545	IFIH1 ; IFITM1 ; IRF1 ; ISG15 ; MX1 ; MX2 ; STAT1 ;
interspecies interaction between organisms	GO:0044419	2%	0.000265560498842995	GTF2B ; IFIH1 ; ISG15 ; SP110 ; STAT1 ;
hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor signal transducer activity	GO:0005062	50%	0.000229893747032626	SP110 ; STAT1 ;
NAD+ ADP-ribosyltransferase activity	GO:0003950	9%	0.0076585955654034	PARP14 ; PARP9 ;
2'-phosphotransferase activity	GO:0008665	100%	0.0210696077402852	NT5C3 ;
polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity	GO:0004654	100%	0.0210696077402852	PNPT1 ;
defense response	GO:0006952	1%	0.0246106177165149	MX1 ; MX2 ; TAP1 ;
CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation	GO:0043374	50%	0.0294821043674367	IRF1 ;
protein tag	GO:0031386	50%	0.0294821043674367	ISG15 ;
pyrimidine nucleoside metabolic process	GO:0006213	33%	0.0401819563761492	NT5C3 ;
ISG15-protein conjugation	GO:0032020	25%	0.0392685890142571	ISG15 ;
eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinase activity	GO:0004694	25%	0.0392685890142571	EIF2AK2 ;
tyrosine phosphorylation of STAT protein	GO:0007260	25%	0.0392685890142571	STAT1 ;
virus-infected cell apoptosis	GO:0006926	25%	0.0392685890142571	EIF2AK2 ;
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of bitter taste	GO:0001580	20%	0.0459939462668341	RTP4 ;

Pathway Name	Pathway Id	Genes Ratio	Pathway p-value (corrected)	Gene Symbols
RIG-I-like receptor signaling pathway	5713	4%	0.0251996780811764	CXCL10 ; IFIH1 ; ISG15 ;
Hydrolysis of cytosolic nucleoside 5'-monophosphates by 5'-nucleotidase, cytosolic III	1621	100%	0.0477539882448336	NT5C3 ;
Inhibition of PKR	1232	100%	0.0477539882448336	EIF2AK2 ;
IFN-gamma pathway	7964	5%	0.0481317457125742	IRF1 ; STAT1 ;

TF Name	TF Id	Genes Ratio	TF p-value (corrected)	Gene Symbols
IRF1	IRF-1	0%	0.0276911580908373	EIF2AK2 ; EPST11 ; IFITM1 ; MX1 ; MX2 ; RTP4 ; SP110 ; USP18 ;

## Annexe V. Fonctions des gènes en commun, des DC infectées par le MYXV et MVA

GO term Name	GO term Id	Genes Ratio	GO term p-value (corrected)	Gene Symbols
response to unfolded protein	GO:0006986	3%	0.0171830927232163	HSPA1A ; HSPA1B ; HSPA4 ; HSPA6 ;
anti-apoptosis	GO:0006916	2%	0.0367104494366337	BCL2A1 ; HSPA1A ; HSPA1B ; MCL1 ;
mRNA catabolic process	GO:0006402	13%	0.0259775659458227	HSPA1A ; HSPA1B ;
phagocytosis	GO:0006909	10%	0.0386918993398046	CD14 ; CORO1C ;
chlordecone reductase activity	GO:0047743	100%	0.034491728226391	AKR1C4 ;
glutamine catabolic process	GO:0006543	100%	0.034491728226391	GLS ;
malonyl-CoA decarboxylase activity	GO:0050080	100%	0.034491728226391	MLYCD ;
methylmalonyl-CoA decarboxylase activity	GO:0004492	100%	0.034491728226391	MLYCD ;
opsonin receptor activity	GO:0001847	100%	0.034491728226391	CD14 ;
organic acid metabolic process	GO:0006082	100%	0.034491728226391	ACADM ;
protein channel activity	GO:0015266	100%	0.034491728226391	MCL1 ;
regulation of fatty acid beta-oxidation	GO:0031998	100%	0.034491728226391	MLYCD ;
3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (B-specific) activity	GO:0047042	50%	0.0375930816025285	AKR1C4 ;
B cell apoptosis	GO:0001783	50%	0.0375930816025285	MYC ;
acetyl-CoA biosynthetic process	GO:0006085	50%	0.0375930816025285	MLYCD ;
cellular chaperone-mediated protein complex assembly	GO:0034619	50%	0.0375930816025285	HSPA4 ;
glutaminase activity	GO:0004359	50%	0.0375930816025285	GLS ;
meiosis I	GO:0007127	50%	0.0375930816025285	CKS2 ;
spermine biosynthetic process	GO:0006597	50%	0.0375930816025285	AMD1 ;
sterol esterase activity	GO:0004771	50%	0.0375930816025285	LIPA ;
glucose metabolic process	GO:0006006	4%	0.0379368209198678	MYC ; TNF ;
positive regulation of cell proliferation	GO:0008284	2%	0.0491731006354514	CDC25B ; CXCL10 ; MYC ;
adenosylmethionine decarboxylase activity	GO:0004014	33%	0.0427393966490342	AMD1 ;
bile acid transmembrane transporter activity	GO:0015125	33%	0.0427393966490342	AKR1C4 ;
carnitine metabolic process	GO:0009437	33%	0.0427393966490342	ACADM ;
peptidyl-amino acid modification	GO:0018193	33%	0.0427393966490342	ASPH ;
positive regulation of heart rate	GO:0010460	33%	0.0427393966490342	EDN1 ;
S phase of mitotic cell cycle	GO:0000084	25%	0.0446239511458577	CDK2AP1 ;
cardiac muscle cell differentiation	GO:0055007	25%	0.0446239511458577	ACADM ;
lipase activity	GO:0016298	25%	0.0446239511458577	LIPA ;
lipopolysaccharide receptor complex	GO:0046696	25%	0.0446239511458577	CD14 ;
mitochondrial outer membrane translocase complex assembly	GO:0070096	25%	0.0446239511458577	HSPA4 ;
peptide-aspartate beta-dioxygenase activity	GO:0004597	25%	0.0446239511458577	ASPH ;
response to molecule of bacterial origin	GO:0002237	25%	0.0446239511458577	CD14 ;
transcription from mitochondrial promoter	GO:0006390	25%	0.0446239511458577	MRPL12 ;
<b>Pathway Name</b>	<b>Pathway Id</b>	<b>Genes Ratio</b>	<b>Pathway p-value (corrected)</b>	<b>Gene Symbols</b>
Hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system	3949	19%	0.00419072013489795	ASPH ; CREB1 ; EDN1 ;

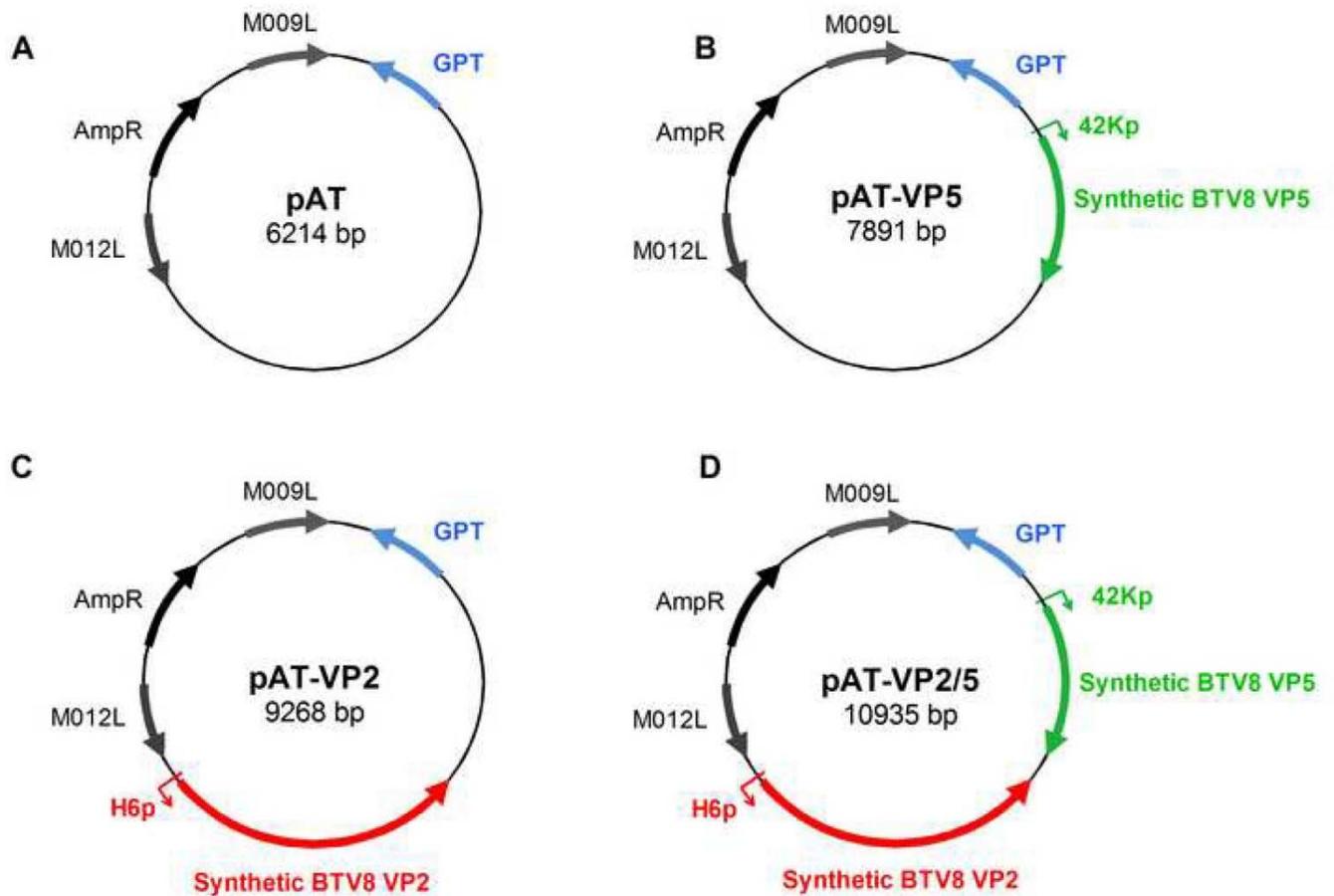
## Annexe VI. Fonctions des gènes en commun, des DC infectées par le MYXV et NYVAC

GO term Name	GO term Id	Genes Ratio	GO term p-value (corrected)	Gene Symbols
interspecies interaction between organisms	GO:0044419	1%	0.0256068241139497	CREB1 ; GTF2B ; KIN ;
CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation	GO:0043374	50%	0.0265224360449774	IRF1 ;
glutaminase activity	GO:0004359	50%	0.0265224360449774	GLS ;
meiosis I	GO:0007127	50%	0.0265224360449774	CKS2 ;
glutamine catabolic process	GO:0006543	100%	0.0309541150762868	GLS ;
opsonin receptor activity	GO:0001847	100%	0.0309541150762868	CD14 ;
positive regulation of heart rate	GO:0010460	33%	0.0347980208740556	EDN1 ;
lipopolysaccharide receptor complex	GO:0046696	25%	0.0371043734990794	CD14 ;
response to molecule of bacterial origin	GO:0002237	25%	0.0371043734990794	CD14 ;
peptidoglycan receptor activity	GO:0016019	20%	0.0386363168350099	CD14 ;
regulation of systemic arterial blood pressure by endothelin	GO:0003100	20%	0.0386363168350099	EDN1 ;
chronic inflammatory response to antigenic stimulus	GO:0002439	14%	0.0432411743815973	TNF ;
cyclin-dependent protein kinase regulator activity	GO:0016538	14%	0.0432411743815973	CKS2 ;
prostaglandin receptor activity	GO:0004955	14%	0.0432411743815973	PPARG ;
spindle organization	GO:0007051	13%	0.0463129658522267	CKS2 ;
phagocytic cup	GO:0001891	11%	0.0490194101789284	TNF ;

Pathway Name	Pathway Id	Genes Ratio	Pathway p-value (corrected)	Gene Symbols
Hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system	3949	13%	0.0263253735771522	CREB1 ; EDN1 ;
The information processing pathway at the ifn beta enhancer	3944	7%	0.044156883692476	GTF2B ; IRF1 ;

**Annexe VII.** Structure des plasmides donneurs pAT (A), pAT-VP5 (B), pAT-VP2 (C), pAT-VP2/5 (D). GPT : cassette de sélection E.co GPT (xanthine-guanine phosphoribosyltransférase), Amp<sup>R</sup> : résistance à l'ampicilline, M009L et M012L : gènes du MYXV, H6p : promoteur du virus de la vaccine, 42k : promoteur entomopoxvirus, VP2 et VP5 sont des gènes synthétiques du BTV-8.



# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. **Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher.** 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787-93.
2. **Abrahao, J. S., M. I. Guedes, G. S. Trindade, F. G. Fonseca, R. K. Campos, B. F. Mota, Z. I. Lobato, A. T. Silva-Fernandes, G. O. Rodrigues, L. S. Lima, P. C. Ferreira, C. A. Bonjardim, and E. G. Kroon.** 2009. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS One* **4**:e7428.
3. **Afonso, C. L., E. R. Tulman, Z. Lu, L. Zsak, G. F. Kutish, and D. L. Rock.** 2000. The genome of fowlpox virus. *J Virol* **74**:3815-31.
4. **Agrawal, S., S. Gupta, and A. Agrawal.** 2009. Vaccinia virus proteins activate human dendritic cells to induce T cell responses in vitro. *Vaccine* **27**:88-92.
5. **Akita, G. Y., M. Ianconescu, N. J. MacLachlan, and B. I. Osburn.** 1994. Bluetongue disease in dogs associated with contaminated vaccine. *Vet Rec* **134**:283-4.
6. **Albina, E., S. Zientara, C. Sailleau, A. Perrin, C. Cêtre-Sossah, E. Bréard, and E. Grillet.** 2007. La fièvre catarrhale ovine (bluetongue): quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie* **11**:63-74.
7. **Allsopp, C. E., M. Plebanski, S. Gilbert, R. E. Sinden, S. Harris, G. Frankel, G. Dougan, C. Hioe, D. Nixon, E. Paoletti, G. Layton, and A. V. Hill.** 1996. Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol* **26**:1951-9.
8. **Anderson, M. J., D. C. Porter, Z. Moldoveanu, T. M. Fletcher, 3rd, S. McPherson, and C. D. Morrow.** 1997. Characterization of the expression and immunogenicity of poliovirus replicons that encode simian immunodeficiency virus SIVmac239 Gag or envelope SU proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:53-62.
9. **Andrew, M., P. Whiteley, V. Janardhana, Z. Lobato, A. Gould, and B. Coupar.** 1995. Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Vet Immunol Immunopathol* **47**:311-22.
10. **Backx, A., C. G. Heutink, E. M. van Rooij, and P. A. van Rijn.** 2007. Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *Vet Rec* **161**:591-2.
11. **Barchichat, S., and E. Katz.** 2002. Immunization of rabbits with a modified vaccinia Ankara recombinant virus bearing the HIV envelope antigen on its outer membrane. *Virus Res* **90**:243-51.
12. **Barratt-Boyes, S. M., and N. J. MacLachlan.** 1994. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet Microbiol* **40**:361-71.
13. **Barratt-Boyes, S. M., P. V. Rossitto, B. C. Taylor, J. A. Ellis, and N. J. MacLachlan.** 1995. Response of the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves. *Vet Immunol Immunopathol* **45**:73-84.
14. **Barrett, J. W., C. Shun Chang, G. Wang, S. J. Werden, Z. Shao, C. Barrett, X. Gao, T. A. Belsito, D. Villeneuve, and G. McFadden.** 2007. Myxoma virus M063R is a host range gene essential for virus replication in rabbit cells. *Virology* **361**:123-32.
15. **Barry, M., S. Hnatiuk, K. Mossman, S. F. Lee, L. Boshkov, and G. McFadden.** 1997. The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is retained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes. *Virology* **239**:360-77.
16. **Batten, C. A., S. Maan, A. E. Shaw, N. S. Maan, and P. P. Mertens.** 2008. A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Res* **137**:56-63.
17. **Beaton, A. R., J. Rodriguez, Y. K. Reddy, and P. Roy.** 2002. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13154-9.
18. **Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks.** 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* **420**:502-7.
19. **Bender, B. S., C. A. Rowe, S. F. Taylor, L. S. Wyatt, B. Moss, and P. A. Small, Jr.** 1996. Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza. *J Virol* **70**:6418-24.
20. **Berhe, G., C. Minet, C. Le Goff, T. Barrett, A. Ngangnou, C. Grillet, G. Libeau, M. Fleming, D. N. Black, and A. Diallo.** 2003. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J Virol* **77**:1571-7.
21. **Bernstein, D. I., M. R. Schleiss, K. Berencsi, E. Gonczol, M. Dickey, P. Khoury, M. Cadoz, C. Meric, J. Zahradnik, A. M. Duliege, and S. Plotkin.** 2002. Effect of previous or simultaneous immunization with canarypox expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) on response to subunit gB vaccine plus MF59 in healthy CMV-seronegative adults. *J Infect Dis* **185**:686-90.
22. **Bertagnoli, S.** 2012. Personal communication.
23. **Bertagnoli, S., J. Gelfi, G. Le Gall, E. Boilletot, J. F. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, F. Petit, C. Boucraut-Baralon, and A. Milon.** 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* **70**:5061-6.

24. **Best, S. M., and P. J. Kerr.** 2000. Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology* **267**:36-48.
25. **Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo.** 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**:1051-7.
26. **Bevan, M. J.** 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* **4**:595-602.
27. **Bhattacharya, B., R. J. Noad, and P. Roy.** 2007. Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J* **4**:7.
28. **Blancou, J., M. P. Kieny, R. Lathe, J. P. Lecocq, P. P. Pastoret, J. P. Soulebot, and P. Desmettre.** 1986. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* **322**:373-5.
29. **Bonneau, K. R., C. D. DeMaula, B. A. Mullens, and N. J. MacLachlan.** 2002. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* **88**:115-25.
30. **Boone, J. D., U. B. Balasuriya, K. Karaca, J. C. Audonnet, J. Yao, L. He, R. Nordgren, F. Monaco, G. Savini, I. A. Gardner, and N. J. MacLachlan.** 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* **25**:672-8.
31. **Borden, E. C., R. E. Shope, and F. A. Murphy.** 1971. Physicochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus--a new taxonomic group. Physicochemical and serological studies. *J Gen Virol* **13**:261-71.
32. **Boshkov, L. K., J. L. Macen, and G. McFadden.** 1992. Virus-induced loss of class I MHC antigens from the surface of cells infected with myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus. *J Immunol* **148**:881-7.
33. **Boyce, M., C. C. Celma, and P. Roy.** 2008. Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* **82**:8339-48.
34. **Boyce, M., J. Wehrfritz, R. Noad, and P. Roy.** 2004. Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J Virol* **78**:3994-4002.
35. **Braverman, Y., and F. Chechik.** 1996. Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Rev Sci Tech* **15**:1037-52.
36. **Breard, E., C. Hamblin, S. Hammoumi, C. Sailleau, G. Dauphin, and S. Zientara.** 2004. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Res Vet Sci* **77**:1-8.
37. **Brewer, A. W., and N. J. MacLachlan.** 1994. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. *Arch Virol* **136**:287-98.
38. **Brown, C. C., J. C. Rhyan, M. J. Grubman, and L. A. Wilbur.** 1996. Distribution of bluetongue virus in tissues of experimentally infected pregnant dogs as determined by in situ hybridization. *Vet Pathol* **33**:337-40.
39. **Brown, J. P., D. R. Twardzik, H. Marquardt, and G. J. Todaro.** 1985. Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature* **313**:491-2.
40. **Broyles, S. S.** 2003. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* **84**:2293-303.
41. **Buller, R. M., S. Chakrabarti, J. A. Cooper, D. R. Twardzik, and B. Moss.** 1988. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* **62**:866-74.
42. **Buller, R. M., K. L. Holmes, A. Hugin, T. N. Frederickson, and H. C. Morse, 3rd.** 1987. Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* **328**:77-9.
43. **Buller, R. M., and G. J. Palumbo.** 1991. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* **55**:80-122.
44. **Buller, R. M., G. L. Smith, K. Cremer, A. L. Notkins, and B. Moss.** 1985. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* **317**:813-5.
45. **Cadoz, M., A. Strady, B. Meignier, J. Taylor, J. Tartaglia, E. Paoletti, and S. Plotkin.** 1992. Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. *Lancet* **339**:1429-32.
46. **Cameron, C., S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J. X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans, and G. McFadden.** 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* **264**:298-318.
47. **Campbell, C. H., T. L. Barber, R. C. Knudsen, and L. M. Swaney.** 1985. Immune response of mice and sheep to bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. *Prog Clin Biol Res* **178**:639-47.
48. **Camus-Bouclainville, C., M. Gretillat, R. Py, J. Gelfi, J. L. Guerin, and S. Bertagnoli.** Genome sequence of SG33 strain and recombination between wild-type and vaccine myxoma viruses. *Emerg Infect Dis* **17**:633-8.
49. **Carter, G. C., M. Law, M. Hollinshead, and G. L. Smith.** 2005. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **86**:1279-90.
50. **Chahroudi, A., R. Chavan, N. Kozyr, E. K. Waller, G. Silvestri, and M. B. Feinberg.** 2005. Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J Virol* **79**:10397-407.

51. **Chaignat, V., G. Worwa, N. Scherrer, M. Hilbe, F. Ehrensperger, C. Batten, M. Cortyen, M. Hofmann, and B. Thuer.** 2009. Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Vet Microbiol* **138**:11-9.
52. **Chakrabarti, S., K. Brechling, and B. Moss.** 1985. Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol Cell Biol* **5**:3403-9.
53. **Chang, W., C. Upton, S. L. Hu, A. F. Purchio, and G. McFadden.** 1987. The genome of Shope fibroma virus, a tumorigenic poxvirus, contains a growth factor gene with sequence similarity to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Mol Cell Biol* **7**:535-40.
54. **Chen, H., R. Reichman, M. Keefer, M. P. McDermott, and X. Jin.** 2005. Establishment of an alternative intracellular cytokine staining assay for HIV/AIDS clinical studies. *J Virol Methods* **123**:131-40.
55. **Cheng, G., X. Zhao, W. Yan, W. Wang, X. Zuo, K. Huang, Y. Liu, J. Chen, J. Wang, W. Cong, M. Liu, H. Gao, J. Chen, Y. Lu, and Z. Zheng.** 2007. Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response. *Vaccine* **25**:5199-208.
56. **Chiang, E. T., D. A. Persaud-Sawin, S. Kulkarni, J. G. Garcia, and F. Imani.** 2006. Bluetongue virus and double-stranded RNA increase human vascular permeability: role of p38 MAPK. *J Clin Immunol* **26**:406-16.
57. **Chung, C. S., C. H. Chen, M. Y. Ho, C. Y. Huang, C. L. Liao, and W. Chang.** 2006. Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J Virol* **80**:2127-40.
58. **Chung, C. S., J. C. Hsiao, Y. S. Chang, and W. Chang.** 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* **72**:1577-85.
59. **Chung, C. S., C. Y. Huang, and W. Chang.** 2005. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *J Virol* **79**:1623-34.
60. **Collin, N., J. L. Guerin, I. Drexler, S. Blanie, J. Gelfi, S. Boullier, G. Foucras, G. Sutter, and F. Messud-Petit.** 2005. The poxviral scrapin MV-LAP requires a myxoma viral infection context to efficiently downregulate MHC-I molecules. *Virology* **343**:171-8.
61. **Condit, R. C., N. Moussatche, and P. Traktman.** 2006. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res* **66**:31-124.
62. **Conraths, F. J., J. M. Gethmann, C. Staubach, T. C. Mettenleiter, M. Beer, and B. Hoffmann.** 2009. Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* **15**:433-5.
63. **Cowley, J. A., and B. M. Gorman.** 1989. Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. *Vet Microbiol* **19**:37-51.
64. **Cruciani, M., C. Mengoli, G. Serpelloni, R. Mazzi, O. Bosco, and M. Malena.** 2007. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as an adjuvant for hepatitis B vaccination: a meta-analysis. *Vaccine* **25**:709-18.
65. **Cudmore, S., P. Cossart, G. Griffiths, and M. Way.** 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378**:636-8.
66. **Cyrklaff, M., C. Risco, J. J. Fernandez, M. V. Jimenez, M. Esteban, W. Baumeister, and J. L. Carrascosa.** 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2772-7.
67. **Dai, P., H. Cao, T. Merghoub, F. Avogadri, W. Wang, T. Parikh, C. M. Fang, P. M. Pitha, K. A. Fitzgerald, M. M. Rahman, G. McFadden, X. Hu, A. N. Houghton, S. Shuman, and L. Deng.** 2011. Myxoma virus induces type I interferon production in murine plasmacytoid dendritic cells via a TLR9/MyD88-, IRF5/IRF7-, and IFNAR-dependent pathway. *J Virol* **85**:10814-25.
68. **Dal Pozzo, F., C. Saegerman, and E. Thiry.** 2009. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. *Vet J* **182**:142-51.
69. **Dales, S., and R. Kajioka.** 1964. The Cycle of Multiplication of Vaccinia Virus in Earle's Strain L Cells. I. Uptake and Penetration. *Virology* **24**:278-94.
70. **Dales, S., and L. Siminovitch.** 1961. The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* **10**:475-503.
71. **Darpel, K. E., C. A. Batten, E. Veronesi, A. E. Shaw, S. Anthony, K. Bachanek-Bankowska, L. Kgosana, A. bin-Tarif, S. Carpenter, U. U. Muller-Doblies, H. H. Takamatsu, P. S. Mellor, P. P. Mertens, and C. A. Oura.** 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. *Vet Rec* **161**:253-61.
72. **Darpel, K. E., C. A. Batten, E. Veronesi, S. Williamson, P. Anderson, M. Dennison, S. Clifford, C. Smith, L. Philips, C. Bidewell, K. Bachanek-Bankowska, A. Sanders, A. Bin-Tarif, A. J. Wilson, S. Gubbins, P. P. Mertens, C. A. Oura, and P. S. Mellor.** 2009. Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in cattle, UK. *Emerg Infect Dis* **15**:2025-8.
73. **De Clercq, K., P. Mertens, I. De Leeuw, C. Oura, P. Houdart, A. C. Potgieter, S. Maan, J.**

- Hooyberghs, C. Batten, E. Vandemeulebroucke, I. M. Wright, N. Maan, F. Riocreux, A. Sanders, Y. Vanderstede, K. Nomikou, M. Raemaekers, A. Bin-Tarif, A. Shaw, M. Henstock, E. Breard, E. Dubois, C. Gastaldi-Thiery, S. Zientara, B. Verheyden, and F. Vandebussche. 2009. Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 2: the occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transbound Emerg Dis* **56**:355-61.
74. DeLange, A. M., and G. McFadden. 1990. The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **163**:71-92.
75. DeMaula, C. D., K. R. Bonneau, and N. J. MacLachlan. 2000. Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus Res* **67**:59-66.
76. DeMaula, C. D., M. A. Jutila, D. W. Wilson, and N. J. MacLachlan. 2001. Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *J Gen Virol* **82**:787-94.
77. DeMaula, C. D., C. M. Leutenegger, K. R. Bonneau, and N. J. MacLachlan. 2002. The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology* **296**:330-7.
78. DeMaula, C. D., C. M. Leutenegger, M. A. Jutila, and N. J. MacLachlan. 2002. Bluetongue virus-induced activation of primary bovine lung microvascular endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* **86**:147-57.
79. den Haan, J. M., and M. J. Bevan. 2001. Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* **13**:437-41.
80. Diallo, A., C. Minet, G. Berhe, C. Le Goff, D. N. Black, M. Fleming, T. Barrett, C. Grillet, and G. Libeau. 2002. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann N Y Acad Sci* **969**:88-91.
81. Dimier, J., A. Ferrier-Rembert, K. Pradeau-Aubreton, M. Hebben, D. Spehner, A. L. Favier, D. Gratier, D. Garin, J. M. Crance, and R. Drillien. 2011. Deletion of major nonessential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice. *J Virol* **85**:5016-26.
82. Diprose, J. M., J. N. Burroughs, G. C. Sutton, A. Goldsmith, P. Gouet, R. Malby, I. Overton, S. Zientara, P. P. Mertens, D. I. Stuart, and J. M. Grimes. 2001. Translocation portals for the substrates and products of a viral transcription complex: the bluetongue virus core. *Embo J* **20**:7229-39.
83. Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau. 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J Gen Virol* **85**:2167-75.
84. Du Toit, R. M. 1944. The transmission of bluetongue and horses sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* **19**:7-16.
85. Dubochet, J., M. Adrian, K. Richter, J. Garces, and R. Wittek. 1994. Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J Virol* **68**:1935-41.
86. Duteyrat, J. L., J. Gelfi, and S. Bertagnoli. 2006. Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch Virol* **151**:2161-80.
87. Eaton, B. T., and G. S. Crameri. 1989. The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes. *J Gen Virol* **70 ( Pt 12)**:3347-53.
88. Eksteen, P. A., and H. Huismans. 1972. Interferon induction by bluetongue virus and bluetongue virus ribonucleic acid. *Onderstepoort J Vet Res* **39**:125-31.
89. El Garch, H., J. M. Minke, J. Rehder, S. Richard, C. Edlund Toulemonde, S. Dinic, C. Andreoni, J. C. Audonnet, R. Nordgren, and V. Juillard. 2008. A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* **123**:230-9.
90. Elbers, A. R., A. Backx, H. M. Ekker, A. N. van der Spek, and P. A. van Rijn. 2008. Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. *Vet Microbiol* **129**:156-62.
91. Elbers, A. R., A. Backx, K. Mintiens, G. Gerbier, C. Staubach, G. Hendrickx, and A. van der Spek. 2008. Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Prev Vet Med* **87**:31-40.
92. Elbers, A. R., J. Popma, S. Oosterwolde, P. A. van Rijn, P. Vellema, and E. M. van Rooij. 2008. A cross-sectional study to determine the seroprevalence of bluetongue virus serotype 8 in sheep and goats in 2006 and 2007 in the Netherlands. *BMC Vet Res* **4**:33.
93. Ellis, J. A., M. L. Coen, N. J. MacLachlan, W. C. Wilson, E. S. Williams, and A. J. Leudke. 1993. Prevalence of bluetongue virus expression in leukocytes from experimentally infected ruminants. *Am J Vet Res* **54**:1452-6.
94. Enserink, M. 2006. Emerging infectious diseases. During a hot summer, bluetongue virus invades northern Europe. *Science* **313**:1218-9.
95. Eppstein, D. A., Y. V. Marsh, A. B. Schreiber, S. R. Newman, G. J. Todaro, and J. J. Nestor,

- Jr. 1985. Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* **318**:663-5.
96. **Erasmus, B. J.** 1975. Bluetongue in sheep and goats. *Aust Vet J* **51**:165-70.
97. **Eschbaumer, M., B. Hoffmann, P. Konig, J. P. Teifke, J. M. Gethmann, F. J. Conraths, C. Probst, T. C. Mettenleiter, and M. Beer.** 2009. Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine* **27**:4169-75.
98. **Evans, D. H., D. Stuart, and G. McFadden.** 1988. High levels of genetic recombination among cotransfected plasmid DNAs in poxvirus-infected mammalian cells. *J Virol* **62**:367-75.
99. **Evermann, J. F., A. J. McKeirnan, L. A. Wilbur, R. L. Levings, E. S. Trueblood, T. J. Baldwin, and F. G. Hughbanks.** 1994. Canine fatalities associated with the use of a modified live vaccine administered during late stages of pregnancy. *J Vet Diagn Invest* **6**:353-7.
100. **Fauquet, C. M.** 2005. Virus taxonomy, C.M. Fauquet, Mayo, M.A, Maniloff, J. Desselberger and Ball, L.A. Elsevier academic press. ed. Eight report of the international Committee on taxonomy of viruses.
101. **Fenner, F., and P. J. Chapple.** 1965. Evolutionary Changes in Myxoma Virus in Britain. an Examination of 222 Naturally Occurring Strains Obtained from 80 Counties During the Period October-November 1962. *J Hyg (Lond)* **63**:175-85.
102. **Fenner, F., and I. D. Marshall.** 1957. A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J Hyg (Lond)* **55**:149-91.
103. **Fenner, F., and I. D. Marshall.** 1954. Passive immunity in myxomatosis of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): the protection conferred on kittens born by immune does. *J Hyg (Lond)* **52**:321-36.
104. **Fenner, F., W. E. Poole, I. D. Marshall, and A. L. Dyce.** 1957. Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. VI. The experimental introduction of the European strain of myxoma virus into Australian wild rabbit populations. *J Hyg (Lond)* **55**:192-206.
105. **Fenner, F., and F. N. Ratcliffe.** 1965. Myxomatosis. Cambridge: Cambridge University in Press.
106. **Fenner, F., and J. Ross.** 1994. The European Rabbit, the History and Biology of successful Colonizer. *Myxomatosis*:205-239.
107. **Ferrari, G., C. De Liberato, G. Scavia, R. Lorenzetti, M. Zini, F. Farina, A. Magliano, G. Cardeti, F. Scholl, M. Guidoni, M. T. Scicluna, D. Amaddeo, P. Scaramozzino, and G. L. Autorino.** 2005. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev Vet Med* **68**:103-13.
108. **Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, and A. Trifileff.** 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* **170**:2106-12.
109. **Flemming, A.** 2011. Cancer: Oncolytic poxvirus homes in on cancer cells. *Nat Rev Drug Discov* **10**:814.
110. **Forzan, M., M. Marsh, and P. Roy.** 2007. Bluetongue virus entry into cells. *J Virol* **81**:4819-27.
111. **Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque.** 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **183**:2593-603.
112. **Foster, N. M., A. J. Luedke, I. M. Parsonson, and T. E. Walton.** 1991. Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res* **52**:192-6.
113. **Foulon, E., and G. Foucras.** 2008. Two populations of ovine bone marrow-derived dendritic cells can be generated with recombinant GM-CSF and separated on CD11b expression. *J Immunol Methods* **339**:1-10.
114. **Fournillier, A., E. Gerossier, A. Evlashev, D. Schmitt, B. Simon, L. Chatel, P. Martin, N. Silvestre, J. M. Balloul, R. Barry, and G. Inchauspe.** 2007. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* **25**:7339-53.
115. **Franchi, P., M. T. Mercante, G. F. Ronchi, G. Armillotta, S. Ulisse, U. Molini, M. Di Ventura, R. Lelli, G. Savini, and A. Pini.** 2008. Laboratory tests for evaluating the level of attenuation of bluetongue virus. *J Virol Methods* **153**:263-5.
116. **French, T. J., J. J. Marshall, and P. Roy.** 1990. Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J Virol* **64**:5695-700.
117. **French, T. J., and P. Roy.** 1990. Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J Virol* **64**:1530-6.
118. **Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss.** 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:8122-6.

119. **Fulton, R. W., and N. J. Pearson.** 1982. Interferon induction in bovine and feline monolayer cultures by four bluetongue virus serotypes. *Can J Comp Med* **46**:100-2.
120. **Gambles, R. M.** 1949. Bluetongue of sheep in Cyprus. *Journal of comparative pathology* **59**:176-190.
121. **Gard, G. P., D. H. Cybinski, and H. Zakrzewski.** 1984. The isolation of a fourth bovine ephemeral fever group virus. *Aust Vet J* **61**:332.
122. **Goebel, S. J., G. P. Johnson, M. E. Perkus, S. W. Davis, J. P. Winslow, and E. Paoletti.** 1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**:247-66, 517-63.
123. **Goepfert, P. A., M. L. Elizaga, A. Sato, L. Qin, M. Cardinali, C. M. Hay, J. Hural, S. C. DeRosa, O. D. DeFawe, G. D. Tomaras, D. C. Montefiori, Y. Xu, L. Lai, S. A. Kalams, L. R. Baden, S. E. Frey, W. A. Blattner, L. S. Wyatt, B. Moss, and H. L. Robinson.** 2011. Phase 1 safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. *J Infect Dis* **203**:610-9.
124. **Gomez, C. E., J. L. Najera, M. Krupa, and M. Esteban.** 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* **8**:97-120.
125. **Gomez, C. E., J. L. Najera, M. Krupa, B. Perdiguero, and M. Esteban.** 2011. MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* **11**:189-217.
126. **Gonzalez, J. M., L. Figueras, M. E. Ortega, M. Lozano, M. R. de Arcaute, R. Royo, L. M. Cebrian, L. M. Ferrer, F. Farinas, J. A. de Jalón, and M. De las Heras.** 2010. Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines. *Vet Rec* **166**:757-8.
127. **Gouet, P., J. M. Diprose, J. M. Grimes, R. Malby, J. N. Burroughs, S. Zientara, D. I. Stuart, and P. P. Mertens.** 1999. The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* **97**:481-90.
128. **Gould, A. R., and A. D. Hyatt.** 1994. The orbivirus genus. Diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **17**:163-88.
129. **Griffiths, G., R. Wepf, T. Wendt, J. K. Locker, M. Cyrklaff, and N. Roos.** 2001. Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis. *J Virol* **75**:11034-55.
130. **Grimes, J. M., J. N. Burroughs, P. Gouet, J. M. Diprose, R. Malby, S. Zientara, P. P. Mertens, and D. I. Stuart.** 1998. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature* **395**:470-8.
131. **Grosenbaugh, D. A., T. Leard, and M. C. Pardo.** 2006. Protection from challenge following administration of a canarypox virus-vectored recombinant feline leukemia virus vaccine in cats previously vaccinated with a killed virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc* **228**:726-7.
132. **Grubisha, O., and P. Traktman.** 2003. Genetic analysis of the vaccinia virus I6 telomere-binding protein uncovers a key role in genome encapsidation. *J Virol* **77**:10929-42.
133. **Guerin, J. L., J. Gelfi, S. Boullier, M. Delverdier, F. A. Bellanger, S. Bertagnoli, I. Drexler, G. Sutter, and F. Messud-Petit.** 2002. Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J Virol* **76**:2912-23.
134. **Guerra, S., J. L. Najera, J. M. Gonzalez, L. A. Lopez-Fernandez, N. Climent, J. M. Gatell, T. Gallart, and M. Esteban.** 2007. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J Virol* **81**:8707-21.
135. **Han, Z., and R. N. Harty.** 2004. The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem* **279**:43092-7.
136. **Hardy, W. T., and D. A. Price.** 1952. Soremuzzle of sheep. *J Am Vet Med Assoc* **120**:23-5.
137. **Harenberg, A., F. Guillaume, E. J. Ryan, N. Burdin, and F. Spada.** 2008. Gene profiling analysis of ALVAC infected human monocyte derived dendritic cells. *Vaccine* **26**:5004-13.
138. **Hemati, B., V. Contreras, C. Urien, M. Bonneau, H. H. Takamatsu, P. P. Mertens, E. Breard, C. Sailleau, S. Zientara, and I. Schwartz-Cornil.** 2009. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J Virol* **83**:8789-99.
139. **Henrich, M., M. Reinacher, and H. P. Hamann.** 2007. Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet Rec* **161**:764.
140. **Hervas-Stubbs, S., P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc.** 2007. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J Immunol* **178**:2361-9.
141. **Hessel, A., M. Schwendinger, D. Fritz, S. Coulibaly, G. W. Holzer, N. Sabarth, O. Kistner, W. Wodal, A. Kerschbaum, H. Savidis-Dacho, B. A. Crowe, T. R. Kreil, P. N. Barrett, and F. G. Falkner.** 2010. A pandemic influenza H1N1 live vaccine based on modified vaccinia Ankara is highly immunogenic and protects mice in active and passive immunizations. *PLoS One* **5**:e12217.
142. **Hodge, J. W., J. P. McLaughlin, J. A. Kantor, and J. Schlom.** 1997. Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant non-replicating avian pox virus to

- enhance T-cell immunity and antitumor responses. *Vaccine* **15**:759-68.
143. **Hofbauer, G. F., T. Baur, M. C. Bonnet, E. Tartour, G. Burg, N. L. Berinstein, and R. Dummer.** 2008. Clinical phase I intratumoral administration of two recombinant ALVAC canarypox viruses expressing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2: the transgene determines the composition of the inflammatory infiltrate. *Melanoma Res* **18**:104-11.
144. **Hofmann, M. A., S. Renzullo, M. Mader, V. Chaignat, G. Worwa, and B. Thuer.** 2008. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* **14**:1855-61.
145. **Hruby, D. E.** 1990. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin Microbiol Rev* **3**:153-70.
146. **Hsiao, J. C., C. S. Chung, and W. Chang.** 1999. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* **73**:8750-61.
147. **Huismans, H.** 1969. Bluetongue virus-induced interferon synthesis. *Onderstepoort J Vet Res* **36**:181-5.
148. **Huismans, H., and B. J. Erasmus.** 1981. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* **48**:51-8.
149. **Huismans, H., and A. A. Van Dijk.** 1990. Bluetongue virus structural components. *Curr Top Microbiol Immunol* **162**:21-41.
150. **Hutcheon, D.** 1881. Fever or epizootic catarrh.
151. **Hutcheon, D.** 1902. Malarial catarrhal fever of sheep. *The veterinary record* **4**:629-633.
152. **Hyatt, A. D., Y. Zhao, and P. Roy.** 1993. Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. *Virology* **193**:592-603.
153. **Ichihashi, Y.** 1996. Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology* **217**:478-85.
154. **Ignatius, R., M. Marovich, E. Mehlhop, L. Villamide, K. Mahnke, W. I. Cox, F. Isdell, S. S. Frankel, J. R. Mascola, R. M. Steinman, and M. Pope.** 2000. Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J Virol* **74**:11329-38.
155. **Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman.** 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**:1693-702.
156. **Jackson, R. J., D. F. Hall, and P. J. Kerr.** 1999. Myxoma virus encodes an alpha2,3-sialyltransferase that enhances virulence. *J Virol* **73**:2376-84.
157. **Jameson, P., C. K. Schoenherr, and S. E. Grossberg.** 1978. Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice. *Infect Immun* **20**:321-3.
158. **Janardhana, V., M. E. Andrew, Z. I. Lobato, and B. E. Coupar.** 1999. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Res Vet Sci* **67**:213-21.
159. **Janeway, A., P. Travers, M. Walport, and Schlomchik.** 2001. Immunobiology, First Edition ed. The immune system in Health and disease.
160. **Jauniaux, T. P., K. E. De Clercq, D. E. Cassart, S. Kennedy, F. E. Vandebussche, E. L. Vandemeulebroucke, T. M. Vanbinst, B. I. Verheyden, N. E. Goris, and F. L. Coignoul.** 2008. Bluetongue in Eurasian lynx. *Emerg Infect Dis* **14**:1496-8.
161. **Jeggo, M. H., I. D. Gumm, and W. P. Taylor.** 1983. Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Res Vet Sci* **34**:205-11.
162. **Jeggo, M. H., and R. C. Wardley.** 1985. Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine* **3**:57-8.
163. **Jeggo, M. H., and R. C. Wardley.** 1982. Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. *Immunology* **45**:629-35.
164. **Jeggo, M. H., and R. C. Wardley.** 1982. Production of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus following various immunisation procedures. *Res Vet Sci* **33**:212-5.
165. **Jeggo, M. H., R. C. Wardley, and J. Brownlie.** 1985. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Prog Clin Biol Res* **178**:477-87.
166. **Jeggo, M. H., R. C. Wardley, and J. Brownlie.** 1984. A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* **52**:403-10.
167. **Jeggo, M. H., R. C. Wardley, and W. P. Taylor.** 1984. Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection. *Res Vet Sci* **36**:81-6.
168. **Johnson, D. J., E. N. Ostlund, D. E. Stallknecht, V. H. Goekjian, M. Jenkins-Moore, and S. C. Harris.** 2006. First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States. *J Vet Diagn Invest* **18**:398-401.
169. **Johnston, J. B., J. W. Barrett, W. Chang, C. S. Chung, W. Zeng, J. Masters, M. Mann, F. Wang, J. Cao, and G. McFadden.** 2003. Role of the serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J Virol* **77**:5877-88.

170. **Johnston, J. B., S. H. Nazarian, R. Natale, and G. McFadden.** 2005. Myxoma virus infection of primary human fibroblasts varies with cellular age and is regulated by host interferon responses. *Virology* **332**:235-48.
171. **Johnston, J. B., G. Wang, J. W. Barrett, S. H. Nazarian, K. Colwill, M. Moran, and G. McFadden.** 2005. Myxoma virus M-T5 protects infected cells from the stress of cell cycle arrest through its interaction with host cell cullin-1. *J Virol* **79**:10750-63.
172. **Jones, L. D., T. Chuma, R. Hails, T. Williams, and P. Roy.** 1996. The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *J Gen Virol* **77 (Pt 5)**:997-1003.
173. **Jones, L. D., T. Williams, D. Bishop, and P. Roy.** 1997. Baculovirus-expressed nonstructural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**:297-301.
174. **Joubert, L., E. Leftheiothis, and J. Mouchet.** 1972. La myxomatose spontanée. Paris: l'expansion scientifique française:343-393.
175. **Kahrs, R. F., E. P. Gibbs, and R. E. Larsen.** 1980. The search for viruses in bovine semen, a review. *Theriogenology* **14**:151-65.
176. **Kar, A. K., B. Bhattacharya, and P. Roy.** 2007. Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol Biol* **8**:4.
177. **Karupiah, G., Q. W. Xie, R. M. Buller, C. Nathan, C. Duarte, and J. D. MacMicking.** 1993. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* **261**:1445-8.
178. **Kastenmuller, W., I. Drexler, H. Ludwig, V. Erfle, C. Peschel, H. Bernhard, and G. Sutter.** 2006. Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. *Virology* **350**:276-88.
179. **Katz, E., and B. Moss.** 1997. Immunogenicity of recombinant vaccinia viruses that display the HIV type 1 envelope glycoprotein on the surface of infectious virions. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:1497-500.
180. **Katze, M. G., Y. He, and M. Gale, Jr.** 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2**:675-87.
181. **Kempe, C. H.** 1960. Studies smallpox and complications of smallpox vaccination. *Pediatrics* **26**:176-189.
182. **Kerr, P., and G. McFadden.** 2002. Immune responses to myxoma virus. *Viral Immunol* **15**:229-46.
183. **Kitching, R. P., and J. M. Hammond.** 1998. Poxvirus, infection and immunity, Second Edition ed. *Encyclopedia of immunology*.
184. **Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo.** 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**:485-517.
185. **Kusov, Y. Y., N. A. Zamjatina, V. F. Poleschuk, M. I. Michailov, G. Morace, J. Eberle, and V. Gauss-Muller.** 2007. Immunogenicity of a chimeric hepatitis A virus (HAV) carrying the HIV gp41 epitope 2F5. *Antiviral Res* **73**:101-11.
186. **Kwak, H., W. Mustafa, K. Speirs, A. J. Abdool, Y. Paterson, and S. N. Isaacs.** 2004. Improved protection conferred by vaccination with a recombinant vaccinia virus that incorporates a foreign antigen into the extracellular enveloped virion. *Virology* **322**:337-48.
187. **Lalani, A. S., J. Masters, W. Zeng, J. Barrett, R. Pannu, H. Everett, C. W. Arendt, and G. McFadden.** 1999. Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science* **286**:1968-71.
188. **Laurence, D. J., and B. A. Gusterson.** 1990. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. *Tumour Biol* **11**:229-61.
189. **Law, M., G. C. Carter, K. L. Roberts, M. Hollinshead, and G. L. Smith.** 2006. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5989-94.
190. **Law, M., M. Hollinshead, H. J. Lee, and G. L. Smith.** 2004. Yaba-like disease virus protein Y144R, a member of the complement control protein family, is present on enveloped virions that are associated with virus-induced actin tails. *J Gen Virol* **85**:1279-90.
191. **Lee, M. S., J. M. Roos, L. C. McGuigan, K. A. Smith, N. Cormier, L. K. Cohen, B. E. Roberts, and L. G. Payne.** 1992. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* **66**:2617-30.
192. **Lefèvre, P. C.** 2003. La fièvre catarrhale ovine du mouton., P. C. Lefèvre, Blancou, J. and Chermette, R: Eds Tec & doc. Tome 1. ed.
193. **Lin, C. L., C. S. Chung, H. G. Heine, and W. Chang.** 2000. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* **74**:3353-65.
194. **Liu, H. M., T. F. Booth, and P. Roy.** 1992. Interactions between bluetongue virus core and capsid proteins translated in vitro. *J Gen Virol* **73 (Pt 10)**:2577-84.
195. **Liu, L., R. Chavan, and M. B. Feinberg.** 2008. Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of

- virus-specific T cell responses in vivo. *BMC Immunol* **9**:15.
196. **Liu, X., M. Kremer, and S. S. Broyles.** 2004. A natural vaccinia virus promoter with exceptional capacity to direct protein synthesis. *J Virol Methods* **122**:141-5.
197. **Lobato, Z. I., B. E. Coupar, C. P. Gray, R. Lunt, and M. E. Andrew.** 1997. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet Immunol Immunopathol* **59**:293-309.
198. **Locker, J. K., A. Kuehn, S. Schleich, G. Rutter, H. Hohenberg, R. Wepf, and G. Griffiths.** 2000. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol Biol Cell* **11**:2497-511.
199. **Maan, S., N. S. Maan, A. R. Samuel, R. O'Hara, A. J. Meyer, S. Rao, and P. P. Mertens.** 2004. Completion of the sequence analysis and comparisons of genome segment 2 (encoding outer capsid protein VP2) from representative isolates of the 24 bluetongue virus serotypes. *Vet Ital* **40**:484-8.
200. **Maan, S., N. S. Maan, A. R. Samuel, S. Rao, H. Attoui, and P. P. Mertens.** 2007. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J Gen Virol* **88**:621-30.
201. **Maan, S., N. S. Maan, P. A. van Rijn, R. G. van Gennip, A. Sanders, I. M. Wright, C. Batten, B. Hoffmann, M. Eschbaumer, C. A. Oura, A. C. Potgieter, K. Nomikou, and P. P. Mertens.** 2010. Full genome characterisation of bluetongue virus serotype 6 from the Netherlands 2008 and comparison to other field and vaccine strains. *PLoS One* **5**:e10323.
202. **Mackett, M., G. L. Smith, and B. Moss.** 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* **49**:857-64.
203. **Mackett, M., G. L. Smith, and B. Moss.** 1992. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. 1982. *Biotechnology* **24**:495-9.
204. **MacLachlan, N. J., J. E. Crafford, W. Vernau, I. A. Gardner, A. Goddard, A. J. Guthrie, and E. H. Venter.** 2008. Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet Pathol* **45**:310-5.
205. **MacLachlan, N. J., G. Jagels, P. V. Rossitto, P. F. Moore, and H. W. Heidner.** 1990. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Vet Pathol* **27**:223-9.
206. **MacLachlan, N. J., R. A. Nunamaker, J. B. Katz, M. M. Sawyer, G. Y. Akita, B. I. Osburn, and W. J. Tabachnick.** 1994. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch Virol* **136**:1-8.
207. **MacLachlan, N. J., and J. Thompson.** 1985. Bluetongue virus-induced interferon in cattle. *Am J Vet Res* **46**:1238-41.
208. **Mahrt, C. R., and B. I. Osburn.** 1986. Experimental bluetongue virus infection of sheep; effect of previous vaccination: clinical and immunologic studies. *Am J Vet Res* **47**:1191-7.
209. **Mallardo, M., E. Leithe, S. Schleich, N. Roos, L. Doglio, and J. Krijnse Locker.** 2002. Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *J Virol* **76**:5167-83.
210. **Mansouri, M., E. Bartee, K. Gouveia, B. T. Hovey Nerenberg, J. Barrett, L. Thomas, G. Thomas, G. McFadden, and K. Fruh.** 2003. The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J Virol* **77**:1427-40.
211. **Marovich, M. A., J. R. Mascola, M. A. Eller, M. K. Louder, P. A. Caudrelier, R. El-Habib, S. Ratto-Kim, J. H. Cox, J. R. Currier, B. L. Levine, C. H. June, W. B. Bernstein, M. L. Robb, B. Schuler-Thurner, R. M. Steinman, D. L. Birx, and S. Schlesinger-Frankel.** 2002. Preparation of clinical-grade recombinant canarypox-human immunodeficiency virus vaccine-loaded human dendritic cells. *J Infect Dis* **186**:1242-52.
212. **Marshall, J. L., R. J. Hoyer, M. A. Toomey, K. Faraguna, P. Chang, E. Richmond, J. E. Pedicano, E. Gehan, R. A. Peck, P. Arlen, K. Y. Tsang, and J. Schlom.** 2000. Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J Clin Oncol* **18**:3964-73.
213. **Martinelle, F., Dal Pozzo F, Sarradin P, De leeuw I, de Clercq, Ziant D.** 2009. Experimental infection of calves with BTV-8 using two different inocula. *Congress of veterinary Virology; 2009 August 23-26 Budapest, Hungary*:p.62.
214. **Massung, R. F., J. J. Esposito, L. I. Liu, J. Qi, T. R. Utterback, J. C. Knight, L. Aubin, T. E. Yuran, J. M. Parsons, V. N. Loparev, and et al.** 1993. Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature* **366**:748-51.
215. **Matsuo, E., and P. Roy.** 2009. Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation. *J Virol* **83**:8842-8.
216. **McCabe, V. J., and N. Spibey.** 2005. Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. *Vaccine* **23**:5380-8.

217. **McCabe, V. J., I. Tarpey, and N. Spibey.** 2002. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine* **20**:2454-62.
218. **McFadden, G.** 2005. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**:201-13.
219. **McIntosh, A. A., and G. L. Smith.** 1996. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J Virol* **70**:272-81.
220. **Meiswinkel, R., L. M. Gomulski, J. C. Delecolle, M. Goffredo, and G. Gasperi.** 2004. The taxonomy of Culicoides vector complexes - unfinished business. *Vet Ital* **40**:151-9.
221. **Mellor, P. S.** 1990. The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* **162**:143-61.
222. **Mercer, J., and A. Helenius.** 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**:531-5.
223. **Mertens, P. P., J. N. Burroughs, A. Walton, M. P. Wellby, H. Fu, R. S. O'Hara, S. M. Brookes, and P. S. Mellor.** 1996. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two Culicoides vector species. *Virology* **217**:582-93.
224. **Mertens, P. P., J. Diprose, S. Maan, K. P. Singh, H. Attoui, and A. R. Samuel.** 2004. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet Ital* **40**:426-37.
225. **Mertens, P. P., S. Pedley, J. Cowley, J. N. Burroughs, A. H. Corteyn, M. H. Jeggo, D. M. Jennings, and B. M. Gorman.** 1989. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* **170**:561-5.
226. **Messud-Petit, F., and S. Bertagnoli.** 2004. [Orthopoxvirus immune evasion mechanism]. *Med Mal Infect* **34 Suppl 1**:S38-9.
227. **Messud-Petit, F., J. Gelfi, M. Delverdier, M. F. Amardeilh, R. Py, G. Sutter, and S. Bertagnoli.** 1998. Serp2, an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. *J Virol* **72**:7830-9.
228. **Meyer, G., C. Lacroux, S. Leger, S. Top, K. Goyeau, M. Deplanche, and M. Lemaire.** 2009. Lethal bluetongue virus serotype 1 infection in llamas. *Emerg Infect Dis* **15**:608-10.
229. **Mills, K. H.** 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**:841-55.
230. **Moingeon, P.** 2004. Recombinant cancer vaccines based on viral vectors. *Dev Biol (Basel)* **116**:117-22; discussion 133-43.
231. **Monaco, F., B. Bonfini, M. Zaghini, D. Antonucci, A. Pini, and G. Savini.** 2004. Vaccination of cattle using monovalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotype 2: innocuity, immunogenicity and effect on pregnancy. *Vet Ital* **40**:671-5.
232. **Monaco, F., C. Camma, S. Serini, and G. Savini.** 2006. Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue virus serotype 16. *Vet Microbiol* **116**:45-52.
233. **Monath, T. P.** 2005. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines* **4**:553-74.
234. **Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**:2348-57.
235. **Moss, B.** 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11341-8.
236. **Moss, B.** 2001. Poxviridae: the viruses and their replication, D. M. K. a. P. M. howley ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
237. **Moss, B.** 2006. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**:48-54.
238. **Moss, B.** 1992. Recombinant poxviruses, p. 45-80, Boca Raton : CRC Press ed.
239. **Moss, B.** 1994. Replicating and host-restricted non-replicating vaccinia virus vectors for vaccine development. *Dev Biol Stand* **82**:55-63.
240. **Moss, B., and J. L. Shisler.** 2001. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol* **13**:59-66.
241. **Moulton, J. E.** 1961. Pathology of bluetongue of sheep in California. *J Am Vet Med Assoc* **138**:493-8.
242. **Muller, M. J.** 1995. Veterinary arbovirus vectors in Australia--a retrospective. *Vet Microbiol* **46**:101-16.
243. **Murphy, F. A., E. T. Gibbs, M. C. Hosinek, and M. J. Studdert.** 1999. Veterinary virology. San Diego, California. Academic Press.
244. **Murray, P. K., and B. T. Eaton.** 1996. Vaccines for bluetongue. *Aust Vet J* **73**:207-10.
245. **Mwangi, W., W. C. Brown, H. A. Lewin, C. J. Howard, J. C. Hope, T. V. Baszler, P. Caplazi, J. Abbott, and G. H. Palmer.** 2002. DNA-encoded fetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4+ T cell responses induced by DNA vaccination of outbred animals. *J Immunol* **169**:3837-46.
246. **Nason, E. L., R. Rothagel, S. K. Mukherjee, A. K. Kar, M. Forzan, B. V. Prasad, and P. Roy.** 2004. Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J Virol* **78**:8059-67.
247. **Nathan, C. F., H. W. Murray, M. E. Wiebe, and B. Y. Rubin.** 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* **158**:670-89.
248. **Nietz, W. O.** 1948. Immunological studies on bluetongue in sheep. *Onderstepoort Journal of*

- Veterinary Science and Animal Industry **23**:96-136.
249. **Ober, B. T., P. Bruhl, M. Schmidt, V. Wieser, W. Gritschenberger, S. Coulibaly, H. Savidis-Dacho, M. Gerencer, and F. G. Falkner.** 2002. Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus lister: comparison with modified vaccinia virus Ankara. *J Virol* **76**:7713-23.
250. **Oppenorth, A., D. Strayer, C. Upton, and G. McFadden.** 1992. Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF alpha reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus. *Virology* **186**:175-91.
251. **Oura, C. A., J. L. Wood, A. J. Sanders, A. Bin-Tarif, M. Henstock, L. Edwards, T. Floyd, H. Simmons, and C. A. Batten.** 2009. Seroconversion, neutralising antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep. *Vaccine* **27**:7326-30.
252. **Pacha, R. F., and R. C. Condit.** 1985. Characterization of a temperature-sensitive mutant of vaccinia virus reveals a novel function that prevents virus-induced breakdown of RNA. *J Virol* **56**:395-403.
253. **Paillot, R., J. H. Kydd, T. Sindle, D. Hannant, C. Edlund Toulemonde, J. C. Audonnet, J. M. Minke, and J. M. Daly.** 2006. Antibody and IFN-gamma responses induced by a recombinant canarypox vaccine and challenge infection with equine influenza virus. *Vet Immunol Immunopathol* **112**:225-33.
254. **Panicali, D., S. W. Davis, S. R. Mercer, and E. Paoletti.** 1981. Two major DNA variants present in serially propagated stocks of the WR strain of vaccinia virus. *J Virol* **37**:1000-10.
255. **Paoletti, E.** 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11349-53.
256. **Parker, J., K. A. Herniman, E. P. Gibbs, and R. F. Sellers.** 1975. An experimental inactivated vaccine against bluetongue. *Vet Rec* **96**:284-7.
257. **Pastoret, P. P., and A. Vanderplasschen.** 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**:343-55.
258. **Patel, D. D., C. A. Ray, R. P. Drucker, and D. J. Pickup.** 1988. A poxvirus-derived vector that directs high levels of expression of cloned genes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9431-5.
259. **Payne, L. G., and K. Kristenson.** 1979. Mechanism of vaccinia virus release and its specific inhibition by N1-isonicotinoyl-N2-3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine. *J Virol* **32**:614-22.
260. **Pearson, L. D., and P. Roy.** 1993. Genetically engineered multi-component virus-like particles as veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* **71** ( Pt 5):381-9.
261. **Perkus, M. E., S. J. Goebel, S. W. Davis, G. P. Johnson, E. K. Norton, and E. Paoletti.** 1991. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology* **180**:406-10.
262. **Perrin, A., E. Albina, E. Breard, C. Sailleau, S. Prome, C. Grillet, O. Kwiatek, P. Russo, R. Thiery, S. Zientara, and C. Cetre-Sossah.** 2007. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* **25**:6774-83.
263. **Pignolet, B.** 2007. Interaction virus myxomateux/hôtes : application à la vaccination chez les ruminants. Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse.
264. **Pignolet, B., S. Boullier, J. Gelfi, M. Bozzetti, P. Russo, E. Foulon, G. Meyer, M. Delverdier, G. Foucras, and S. Bertagnoli.** 2008. Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants. *J Gen Virol* **89**:1371-9.
265. **Pignolet, B., J. L. Duteyrat, A. Allemandou, J. Gelfi, G. Foucras, and S. Bertagnoli.** 2007. In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains. *Virol J* **4**:94.
266. **Radostits, O., and J. B. Prescott.** 2001. Further thoughts on whether the veterinary profession is losing its way. *Can Vet J* **42**:701-2.
267. **Reali, E., D. Canter, H. Zeytin, J. Schlom, and J. W. Greiner.** 2005. Comparative studies of Avipox-GM-CSF versus recombinant GM-CSF protein as immune adjuvants with different vaccine platforms. *Vaccine* **23**:2909-21.
268. **Rinaldo, C. R., Jr., J. C. Overall, Jr., and L. A. Glasgow.** 1975. Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells. *Infect Immun* **12**:1070-7.
269. **Roberts, K. L., and G. L. Smith.** 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* **16**:472-9.
270. **Rodriguez, D., M. Esteban, and J. R. Rodriguez.** 1995. Vaccinia virus A17L gene product is essential for an early step in virion morphogenesis. *J Virol* **69**:4640-8.
271. **Romagnani, S.** 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* **12**:227-57.
272. **Romero, C. H., T. Barrett, S. A. Evans, R. P. Kitching, P. D. Gershon, C. Bostock, and D. N. Black.** 1993. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine* **11**:737-42.
273. **Rosel, J., and B. Moss.** 1985. Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b. *J Virol* **56**:830-8.
274. **Roy, P.** 1992. Bluetongue virus proteins. *J Gen Virol* **73** ( Pt 12):3051-64.
275. **Roy, P.** 1992. From genes to complex structures of bluetongue virus and their efficacy as vaccines. *Vet Microbiol* **33**:155-68.

276. **Roy, P.** 1996. Orbiviruses and their replication, Fields Virology, Third Edition ed, vol. 2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
277. **Roy, P.** 1990. Use of baculovirus expression vectors: development of diagnostic reagents, vaccines and morphological counterparts of bluetongue virus. *FEMS Microbiol Immunol* **2**:223-34.
278. **Roy, P., D. H. Bishop, H. LeBlois, and B. J. Erasmus.** 1994. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* **12**:805-11.
279. **Roy, P., M. Boyce, and R. Noad.** 2009. Prospects for improved bluetongue vaccines. *Nat Rev Microbiol* **7**:120-8.
280. **Roy, P., T. French, and B. J. Erasmus.** 1992. Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine* **10**:28-32.
281. **Roy, P., M. Mikhailov, and D. H. Bishop.** 1997. Baculovirus multigene expression vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene* **190**:119-29.
282. **Roy, P., T. Urakawa, A. A. Van Dijk, and B. J. Erasmus.** 1990. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J Virol* **64**:1998-2003.
283. **Rupprecht, C. E., L. Blass, K. Smith, L. A. Orciari, M. Niezgodna, S. G. Whitfield, R. V. Gibbons, M. Guerra, and C. A. Hanlon.** 2001. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med* **345**:582-6.
284. **Russell, J. H., and T. J. Ley.** 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**:323-70.
285. **Russell, R. J., and S. J. Robbins.** 1989. Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome. *Virology* **170**:147-59.
286. **Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda.** 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**:1151-64.
287. **Sallusto, F., and A. Lanzavecchia.** 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**:1109-18.
288. **Samuel, C. E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**:778-809, table of contents.
289. **Sanchez-Puig, J. M., L. Sanchez, G. Roy, and R. Blasco.** 2004. Susceptibility of different leukocyte cell types to Vaccinia virus infection. *Virology* **1**:10.
290. **Sanger, C., E. Muhlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2001. Adverse effects of MVA-T7 on the transport of Marburg virus glycoprotein. *J Virol Methods* **91**:29-35.
291. **Savini, G., N. J. MacLachlan, J. M. Sanchez-Vizcaino, and S. Zientara.** 2008. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**:101-20.
292. **Savini, G., F. Monaco, A. Facchinei, C. Pinoni, S. Salucci, F. Cofini, and M. Di Ventura.** 2004. Field vaccination of sheep with bivalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2 and 9: effect on milk production. *Vet Ital* **40**:627-30.
293. **Savini, G., G. F. Ronchi, A. Leone, A. Ciarelli, P. Migliaccio, P. Franchi, M. T. Mercante, and A. Pini.** 2007. An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Vet Microbiol* **124**:140-6.
294. **Schmelz, M., B. Sodeik, M. Ericsson, E. J. Wolffe, H. Shida, G. Hiller, and G. Griffiths.** 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* **68**:130-47.
295. **Schreurs, M. W., A. A. Eggert, A. J. de Boer, C. G. Figdor, and G. J. Adema.** 1999. Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **29**:2835-41.
296. **Seet, B. T., J. B. Johnston, C. R. Brunetti, J. W. Barrett, H. Everett, C. Cameron, J. Sypula, S. H. Nazarian, A. Lucas, and G. McFadden.** 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**:377-423.
297. **Sen, G. C.** 2001. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**:255-81.
298. **Shen, X., S. B. Wong, C. B. Buck, J. Zhang, and R. F. Siliciano.** 2002. Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. *J Immunol* **169**:4222-9.
299. **Smith, G. L., and M. Law.** 2004. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res* **106**:189-97.
300. **Smith, G. L., M. Mackett, and B. Moss.** 1983. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* **302**:490-5.
301. **Smith, G. L., B. J. Murphy, and M. Law.** 2003. Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol* **57**:323-42.
302. **Smith, G. L., and A. Vanderplasschen.** 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol* **440**:395-414.
303. **Smith, G. L., A. Vanderplasschen, and M. Law.** 2002. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* **83**:2915-31.

304. **Smith, K. A., V. Stallard, J. M. Roos, C. Hart, N. Cormier, L. K. Cohen, B. E. Roberts, and L. G. Payne.** 1993. Host range selection of vaccinia recombinants containing insertions of foreign genes into non-coding sequences. *Vaccine* **11**:43-53.
305. **Snapper, C. M., and W. E. Paul.** 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**:944-7.
306. **Sodeik, B., R. W. Doms, M. Ericsson, G. Hiller, C. E. Machamer, W. van 't Hof, G. van Meer, B. Moss, and G. Griffiths.** 1993. Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J Cell Biol* **121**:521-41.
307. **Soi, R. K., F. R. Rurangirwa, T. C. McGuire, P. M. Rwambo, J. C. DeMartini, and T. B. Crawford.** 2010. Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* **17**:1842-9.
308. **Spiesschaert, B., G. McFadden, K. Hermans, H. Nauwynck, and G. R. Van de Walle.** The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Vet Res* **42**:76.
309. **Spreull, J.** 1905. Malarial catarrhak fever (Bluetongue) of sheep in south Africa. *Journal of comparative pathology* **20**:321-337.
310. **Stanford, M. M., J. W. Barrett, S. H. Nazarian, S. Werden, and G. McFadden.** 2007. Oncolytic virotherapy synergism with signaling inhibitors: Rapamycin increases myxoma virus tropism for human tumor cells. *J Virol* **81**:1251-60.
311. **Stanford, M. M., and G. McFadden.** 2007. Myxoma virus and oncolytic virotherapy: a new biologic weapon in the war against cancer. *Expert Opin Biol Ther* **7**:1415-25.
312. **Stanford, M. M., S. J. Werden, and G. McFadden.** 2007. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet Res* **38**:299-318.
313. **Stevens, D. R., J. Stott, B. I. Osburn, R. Giles, G. P. Wiesehahn, and T. L. Barber.** 1985. Potency and efficacy of inactivated bluetongue virus vaccines. *Prog Clin Biol Res* **178**:649-52.
314. **Stevens, T. L., A. Bossie, V. M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and E. S. Vitetta.** 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* **334**:255-8.
315. **Stewart, M., Y. Bhatia, T. N. Athmaran, R. Noad, C. Gastaldi, E. Dubois, P. Russo, R. Thiery, C. Sailleau, E. Breard, S. Zientara, and P. Roy.** Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus. *Vaccine* **28**:3047-54.
316. **Stüttelaar, K. J., L. S. Wyatt, R. L. de Swart, H. W. Vos, J. Groen, G. van Amerongen, R. S. van Binnendijk, S. Rozenblatt, B. Moss, and A. D. Osterhaus.** 2000. Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J Virol* **74**:4236-43.
317. **Stott, J. L., T. L. Barber, and B. I. Osburn.** 1985. Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. *Am J Vet Res* **46**:1043-9.
318. **Stott, J. L., B. I. Osburn, and T. L. Barber.** 1979. The current status of research on an experimental inactivated bluetongue virus vaccine. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*:55-62.
319. **Sutton, G., J. M. Grimes, D. I. Stuart, and P. Roy.** 2007. Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line. *Nat Struct Mol Biol* **14**:449-51.
320. **Sypula, J., F. Wang, Y. Ma, J. C. Bell, and G. McFadden.** 2004. Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther Mol Biol* **8**:108-114.
321. **Takamatsu, H., J. N. Burroughs, A. M. Wade-Evans, and P. P. Mertens.** 1990. Identification of a bluetongue virus serotype 1-specific ovine helper T-cell determinant in outer capsid protein VP2. *Virology* **177**:396-400.
322. **Takamatsu, H., and M. H. Jeggo.** 1989. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology* **66**:258-63.
323. **Tan, B. H., E. Nason, N. Stauber, W. Jiang, K. Monastyrskaya, and P. Roy.** 2001. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J Virol* **75**:3937-47.
324. **Tao, R., L. Li, W. Huang, and L. Zheng.** 2010. Activation of human dendritic cells by recombinant modified vaccinia virus Ankara vectors encoding survivin and IL-2 genes in vitro. *Hum Gene Ther* **21**:98-108.
325. **Tartaglia, J., W. I. Cox, J. Taylor, M. Perkus, M. Riviere, B. Meignier, and E. Paoletti.** 1992. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:1445-7.
326. **Tartaglia, J., O. Jarrett, J. C. Neil, P. Desmetre, and E. Paoletti.** 1993. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J Virol* **67**:2370-5.
327. **Theiler, A.** 1908. Bluetongue in sheep. Annual Report of the Director of agriculture, transvaal for 1904-1905:110-121.
328. **Thiry, E., C. Saegerman, H. Guyot, P. Kirten, B. Losson, F. Rollin, M. Bodmer, G. Czaplicki, J. F. Toussaint, K. De Clercq, J. M. Dochy, J. Dufey, J. L. Gillemann, and K. Messemann.** 2006. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* **159**:327.

329. **Thrusfield, M.** 1995. *Veterinary Epidemiology*, Second Edition. Blackwell Science Ltd, Oxford, London, Edinburgh, Malden, Carlton, Paris.
330. **Tine, J. A., D. E. Lanar, D. M. Smith, B. T. Welde, P. Schultheiss, L. A. Ware, E. B. Kauffman, R. A. Wirtz, C. De Taisne, G. S. Hui, S. P. Chang, P. Church, M. R. Hollingdale, D. C. Kaslow, S. Hoffman, K. P. Guito, W. R. Ballou, J. C. Sadoff, and E. Paoletti.** 1996. NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* **64**:3833-44.
331. **Top, S., E. Foulon, B. Pignolet, M. Deplanche, C. Caubet, C. Tasca, S. Bertagnoli, G. Meyer, and G. Foucras.** 2011. Infection of nonhost species dendritic cells in vitro with an attenuated myxoma virus induces gene expression that predicts its efficacy as a vaccine vector. *J Virol* **85**:12982-94.
332. **Toussaint, J. F., C. Sailleau, J. Mast, P. Houdart, G. Czaplicki, L. Demeestere, F. VandenBussche, W. van Dessel, N. Goris, E. Breard, L. Bounaadja, T. Etienne, S. Zientara, and K. De Clercq.** 2007. Bluetongue in Belgium, 2006. *Emerg Infect Dis* **13**:614-6.
333. **Tovey, M. G., C. Lallemand, J. F. Meritet, and C. Maury.** 2006. Adjuvant activity of interferon alpha: mechanism(s) of action. *Vaccine* **24 Suppl 2**:S2-46-7.
334. **Tsuru, S., H. Kitani, M. Seno, M. Abe, Y. Zinnaka, and K. Nomoto.** 1983. Mechanism of protection during the early phase of a generalized viral infection. I. Contribution of phagocytes to protection against ectromelia virus. *J Gen Virol* **64** (Pt 9):2021-6.
335. **Ulrich, R., A. Lundkvist, H. Meisel, D. Koletzki, K. B. Sjolander, H. R. Gelderblom, G. Borisova, P. Schnitzler, G. Darai, and D. H. Kruger.** 1998. Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* **16**:272-80.
336. **Upton, C., J. L. Macen, and G. McFadden.** 1987. Mapping and sequencing of a gene from myxoma virus that is related to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Virol* **61**:1271-5.
337. **Urakawa, T., T. J. French, Y. Adachi, A. Fukusho, H. LeBlois, M. Flamand, P. Mertens, and P. Roy.** 1994. Synthesis of recombinant baculoviruses expressing the outer capsid protein VP2 of five BTM serotypes and the induction of neutralizing antibodies to homologous and heterologous BTM serotypes. *Virus Res* **31**:149-61.
338. **Van Regenmortel, M. H., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. E. Wickner.** 2000. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego, California. Academic Press.
339. **Vanderplasschen, A., M. Hollinshead, and G. L. Smith.** 1998. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J Gen Virol* **79** (Pt 4):877-87.
340. **Venter, G. J., and R. Meiswinkel.** 1994. The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the eastern Orange Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. *Onderstepoort J Vet Res* **61**:327-40.
341. **Veronesi, E., C. Hamblin, and P. S. Mellor.** 2005. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine* **23**:5509-16.
342. **Verwoerd, D. W., and B. J. Erasmus.** 1994. *Bluetongue, Infectious diseases of Livestock with special references to southern Africa* ed. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
343. **Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman.** 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**:523-32.
344. **Vilagines, P., and R. Vilagines.** 1985. *Les poxviridés*, J. Maury : Flammarion Médecine Sciences ed.
345. **Villadangos, J. A., W. R. Heath, and F. R. Carbone.** 2007. Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends Immunol* **28**:45-7.
346. **Wade-Evans, A. M., C. H. Romero, P. Mellor, H. Takamatsu, J. Anderson, J. Thevasagayam, M. J. Fleming, P. P. Mertens, and D. N. Black.** 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* **220**:227-31.
347. **Wallace, D. B., and G. J. Viljoen.** 2005. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine* **23**:3061-7.
348. **Wang, F., Y. Ma, J. W. Barrett, X. Gao, J. Loh, E. Barton, H. W. Virgin, and G. McFadden.** 2004. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol* **5**:1266-74.
349. **Wang, Z., C. La Rosa, R. Maas, H. Ly, J. Brewer, S. Mekhoubad, P. Daftarian, J. Longmate, W. J. Britt, and D. J. Diamond.** 2004. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J Virol* **78**:3965-76.

350. **Weyer, J., C. E. Rupprecht, J. Mans, G. J. Viljoen, and L. H. Nel.** 2007. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine* **25**:4213-22.
351. **WHO.** 1980. The global eradication of smallpox. Final report of the commission for the certification of smallpox eradication. *Hystory of international public health*, n°4.
352. **Williams, M. A., and M. J. Bevan.** 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* **25**:171-92.
353. **Wilson, W. C., K. A. Bernard, B. A. Israel, and J. O. Mecham.** 2008. Bluetongue virus serotype 17 sequence variation associated with neutralization. *DNA Seq* **19**:237-40.
354. **Wittmann, E. J., P. S. Mello, and M. Baylis.** 2002. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med Vet Entomol* **16**:147-56.
355. **Worwa, G., B. Thur, C. Griot, M. Hofmann, J. N. MacLachlan, and V. Chaignat.** 2008. [Bluetongue disease in Swiss sheep breeds: clinical signs after experimental infection with bluetongue virus serotype 8]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **150**:491-8.
356. **Xu, G., W. Wilson, J. Mecham, K. Murphy, E. M. Zhou, and W. Tabachnick.** 1997. VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *J Gen Virol* **78** (Pt 7):1617-23.
357. **Yammani, R. D., S. Pejawar-Gaddy, T. C. Gurley, E. T. Weimer, E. M. Hiltbold, and M. A. Alexander-Miller.** 2008. Regulation of maturation and activating potential in CD8+ versus CD8- dendritic cells following in vivo infection with vaccinia virus. *Virology* **378**:142-50.
358. **Yates, N. L., and M. A. Alexander-Miller.** 2007. Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. *Virology* **359**:349-61.
359. **Yoon, H. A., A. G. Aleyas, J. A. George, S. O. Park, Y. W. Han, J. H. Lee, J. G. Cho, and S. K. Eo.** 2006. Cytokine GM-CSF genetic adjuvant facilitates prophylactic DNA vaccine against pseudorabies virus through enhanced immune responses. *Microbiol Immunol* **50**:83-92.
360. **Young, H. A.** 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **16**:563-8.
361. **Zanella, G., B. Durand, E. Sellal, E. Breard, C. Sailleau, S. Zientara, C. A. Batten, P. Mathevet, and C. Audeval.** Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008-2009. *Theriogenology* **77**:65-72.
362. **Zientara, S., C. Sailleau, G. Dauphin, C. Roquier, E. M. Remond, F. Lebreton, S. Hammoumi, E. Dubois, C. Agier, G. Merle, and E. Breard.** 2002. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec* **150**:598-601.
363. **Zuniga, M. C.** 2003. Lessons in detente or know thy host: the immunomodulatory gene products of myxoma virus. *J Biosci* **28**:273-85.



**Auteur:** Sokunthea TOP

**Titre:** Le virus myxomateux, vecteur vaccinal chez les ruminants : application à la bluetongue

**Directeurs de thèse:** Gilles MEYER / Gilles FOUCRAS

**Lieu de soutenance:** ENVT-Toulouse 2012

---

## Résumé

Les poxvirus sont considérés comme des vecteurs vaccinaux de choix. Parmi eux le virus myxomateux (MYXV) prototype du genre *leporipoxvirus* a été positivement évalué chez différentes espèces animales, excepté les ruminants.

Dans ce travail, nous avons évalué la souche atténuée SG33 du MYXV en tant que vecteur vaccinal non réplicatif chez les moutons. Dans un premier temps, nous avons étudié les interactions entre le SG33 et les cellules dendritiques (DC). Nous avons montré *in vitro* que le SG33 est capable d'infecter les DC, et préférentiellement la sous-population de DC de type Langerhans. Bien que le cycle de réplication du SG33 soit abortif, l'expression du transgène dans ces cellules a été démontrée. Après maturation, les DC ovines restent sensibles au SG33 mais entrent en apoptose dans les huit heures qui suivent l'infection. *In fine*, l'analyse du profil d'expression génique des DC infectées, montre que la majorité des gènes surexprimés est impliquée dans la réponse inflammatoire, la réponse immune et les voies de signalisation des interférons de type I.

Par la suite, l'efficacité du SG33 comme vecteur vaccinal chez le mouton a été démontrée en utilisant comme modèle d'épreuve une souche hypervirulente du virus de la bluetongue (BTV). Des moutons ont été immunisés avec du SG33 exprimant la protéine VP2 associée ou non à la protéine VP5 du BTV. Seule l'immunisation avec le SG33 exprimant VP2 a permis d'induire une protection clinique et virologique contre une inoculation d'épreuve avec le BTV homologue. La protection est corrélée à la présence d'anticorps neutralisants chez les moutons avant inoculation d'épreuve. Les niveaux de VP2 produite par les 2 virus recombinants seraient à l'origine de la différence de protection observée. Finalement, la protéine VP7 étant responsable d'une protection croisée partielle entre sérotypes du BTV, nous avons montré que l'inoculation intradermique de SG33 exprimant VP7 à des moutons, induisait l'apparition d'une réponse humorale et cellulaire CD4<sup>+</sup> spécifique de VP7. Toutefois, cette réponse immunitaire ne s'est pas révélée protectrice lors d'une inoculation d'épreuve hétérologue.

Ces résultats indiquent que le MYXV est capable d'induire une réponse immune adaptative efficace, conduisant à une protection significative contre une inoculation d'épreuve sévère, faisant de ce virus, un vecteur prometteur pour la vaccination des ruminants.

---

**Mots clé :** virus myxomateux, vaccin, ruminants, Bluetongue, cellules dendritiques

**Discipline :** Virologie

---



## Summary

Poxviruses are deemed as vaccine vectors of choice. Among them, the myxoma virus (MYXV), the prototype of the *Leporipoxvirus* genus has proved its efficacy in different animal species but not in ruminants. In this work, we evaluated SG33, an attenuated strain of MYXV as a non-replicative vaccine vector in sheep.

In a first study, we examined interactions between SG33 and ovine dendritic cells. We showed *in vitro* that SG33 infect ovine dendritic cells (DC) mainly the subpopulation of Langerhans-type. Expression of the recombinant antigen was demonstrated although the cycle of SG33 replication was abortive. After maturation, the ovine DC remained susceptible to MYXV, although apoptosis occurred within eight hours after infection. Finally, analysis of the gene expression profile of infected DC highlighted that most overexpressed genes are involved in the inflammatory and immune responses, and the signaling pathways of type I interferon.

Subsequently, the final demonstration of the SG33 efficacy as a vaccine vector in sheep was carried out using as challenge experiment. We used a highly virulent bluetongue virus challenge model to test protection of sheep previously immunised with SG33 expressing the major VP2 protein antigen of BTV, associated or not with the VP5 protein. We showed that only two immunisations with SG33 expressing VP2 alone elicited a significant clinical and virological protection in sheep against the homologous BTV challenge. Protection was mainly correlated with the presence of neutralising antibodies in sheep before challenge. Differences of VP2 expression between the two SG33 recombinant viruses may explain the differences of protection observed in this study. Finally, since VP7 protein of BTV was suggested to induce cross protective immunity between BTV serotypes, we showed that intradermal inoculation of sheep with SG33 expressing the VP7 protein, can generate an humoral and a CD4<sup>+</sup> cellular immune response specific to VP7. However, this immune response did not provide protection against an heterologous BTV challenge.

Taken together, these results indicate that MYXV is able to induce an effective adaptive immune response in sheep, leading to significant protection against a severe challenge, making this virus a promising vector for vaccination of ruminants.

---

**Key words:** *Myxoma virus*, vaccine, ruminants, bluetongue, dendritic cell







**Auteur:** Sokunthea TOP

**Titre:** Le virus myxomateux, vecteur vaccinal chez les ruminants : application à la bluetongue

**Directeurs de thèse:** Gilles MEYER / Gilles FOUCRAS

**Lieu de soutenance:** ENVT-Toulouse 2012

---

## Résumé

Les poxvirus sont considérés comme des vecteurs vaccinaux de choix. Parmi eux le virus myxomateux (MYXV) prototype du genre *leporipoxvirus* a été positivement évalué chez différentes espèces animales, excepté les ruminants.

Dans ce travail, nous avons évalué la souche atténuée SG33 du MYXV en tant que vecteur vaccinal non répliatif chez les moutons. Dans un premier temps, nous avons étudié les interactions entre le SG33 et les cellules dendritiques (DC). Nous avons montré *in vitro* que le SG33 est capable d'infecter les DC, et préférentiellement la sous-population de DC de type Langerhans. Bien que le cycle de réplication du SG33 soit abortif, l'expression du transgène dans ces cellules a été démontrée. Après maturation, les DC ovines restent sensibles au SG33 mais entrent en apoptose dans les huit heures qui suivent l'infection. *In fine*, l'analyse du profil d'expression génique des DC infectées, montre que la majorité des gènes surexprimés est impliquée dans la réponse inflammatoire, la réponse immune et les voies de signalisation des interférons de type I.

Par la suite, l'efficacité du SG33 comme vecteur vaccinal chez le mouton a été démontrée en utilisant comme modèle d'épreuve une souche hypervirulente du virus de la bluetongue (BTV). Des moutons ont été immunisés avec du SG33 exprimant la protéine VP2 associée ou non à la protéine VP5 du BTV. Seule l'immunisation avec le SG33 exprimant VP2 a permis d'induire une protection clinique et virologique contre une inoculation d'épreuve avec le BTV homologue. La protection est corrélée à la présence d'anticorps neutralisants chez les moutons avant inoculation d'épreuve. Les niveaux de VP2 produite par les 2 virus recombinants seraient à l'origine de la différence de protection observée. Finalement, la protéine VP7 étant responsable d'une protection croisée partielle entre sérotypes du BTV, nous avons montré que l'inoculation intradermique de SG33 exprimant VP7 à des moutons, induisait l'apparition d'une réponse humorale et cellulaire CD4<sup>+</sup> spécifique de VP7. Toutefois, cette réponse immunitaire ne s'est pas révélée protectrice lors d'une inoculation d'épreuve hétérologue.

Ces résultats indiquent que le MYXV est capable d'induire une réponse immune adaptative efficace, conduisant à une protection significative contre une inoculation d'épreuve sévère, faisant de ce virus, un vecteur prometteur pour la vaccination des ruminants.

---

**Mots clé :** virus myxomateux, vaccin, ruminants, Bluetongue, cellules dendritiques

**Discipline :** Virologie