



HAL
open science

Etude de l'immunité cellulaire après vaccination antirabique chez le chien, mise au point d'une nouvelle méthode de qPCR.

Mélanie Biarnais

► **To cite this version:**

Mélanie Biarnais. Etude de l'immunité cellulaire après vaccination antirabique chez le chien, mise au point d'une nouvelle méthode de qPCR.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. hal-02000944

HAL Id: hal-02000944

<https://ephe.hal.science/hal-02000944>

Submitted on 8 Feb 2019

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.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

BADRÉ-BIARNAIS Mélanie

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

Etude de l'immunité cellulaire après vaccination antirabique chez le chien, mise au point d'une nouvelle méthode de qPCR.

soutenu le 21 décembre 2018

devant le jury suivant :

Dr. STOCKHOLM Daniel - **Président**
Dr. CLIQUET Florence - **Tutrice scientifique**
Pr. CANQUE Bruno - **Tuteur pédagogique**
Dr. BIANCHI Arnaud - **Rapporteur**
Dr. VELOT Emilie - **Examinatrice**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. CLIQUET Florence

Intitulé de la structure d'accueil : Laboratoire ANSES de la rage et la faune sauvage de Nancy

Directrice : Dr. MONCHÂTRE-LEROY Elodie

et de

Pr. CANQUE Bruno

Intitulé de la structure d'accueil : UMR INSERM/UPVII/EPHE 1126, Institut Universitaire d'Hématologie, Centre Hayem, Hôpital Saint Louis

Directeur : Dr BORIES Jean Christophe

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : MODÉLISATION, ÉPI-GÉNÉTIQUE ET DÉVELOPPEMENT (MÉDÉ)



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

BADRÉ-BIARNAIS Mélanie

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

Etude de l'immunité cellulaire après vaccination antirabique chez le chien, mise au point d'une nouvelle méthode de qPCR.

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**Etude de l'immunité cellulaire après vaccination antirabique chez le chien,
mise au point d'une nouvelle méthode de qPCR.**

BADRÉ-BIARNAIS Mélanie

soutenu le 21 décembre 2018

RÉSUMÉ :

La vaccination de masse des chiens avec un vaccin vivant atténué par voie orale pourrait apporter un espoir dans la disparition de la rage humaine dans le monde. Le chien est, dans les pays en développement, le principal vecteur pour l'Homme de la rage et responsable d'environ 59000 décès chaque année. La vaccination orale a permis l'élimination du virus de nombreuses populations animales sauvages de l'Union Européenne.

Cette stratégie vaccinale tente depuis plusieurs années d'être adaptée au chien mais elle est largement freinée par l'absence d'un indicateur pertinent de l'efficacité vaccinale sur le terrain. En effet, des chiens vaccinés en conditions expérimentales par voie orale avec SAG2, V-RG et différents vaccins à virus rabique recombinant (virus vivants atténués) peuvent survivre à une épreuve virulente, et ce malgré l'absence d'anticorps neutralisant le virus rabique (RVNA). La mesure du taux de RVNA dans le sang, couramment utilisée pour évaluer l'efficacité des campagnes de vaccination réalisées à l'aide de vaccins inactivés, n'est donc pas un outil fiable chez le chien vacciné par voie orale et un autre indicateur de l'immunité est nécessaire.

L'immunité cellulaire antirabique développée lors de la vaccination est portée par les lymphocytes T mémoires spécifiques du virus, présents dans l'organisme pendant plusieurs années, quelques uns circulant dans le sang périphérique.

Ces cellules peuvent être réactivées *in vitro* de façon spécifique avec un antigène rabique. Deux populations de lymphocytes T auxiliaires vont alors sécréter de l'Interféron gamma ($IFN\gamma$) et de l'Interleukine 4 (IL-4). On peut révéler ces cellules, les cytokines sécrétées ou les transcrits de leur gène, par plusieurs techniques.

Dans ce projet, nous avons réalisé la mise au point d'une qPCR pouvant révéler la surexpression des cytokines par les cellules, avec un activateur non spécifique.

Lors d'une comparaison avec des animaux vaccinés avec un vaccin inactivé ou avec un vaccin vivant, nous avons montré une réponse spécifique à $IFN\gamma$ par ELISPOT pour les deux populations d'animaux. Seule l'expression de IL-4 a montré le même profil en qPCR et ce, pour les animaux vaccinés avec un vaccin vivant. Il est nécessaire de tester ces méthodes dans le cadre d'un protocole d'efficacité vaccinale avec des animaux vaccinés avec un vaccin vivant par voie orale.

Dans le cas d'une réponse significative, les techniques retenues pourraient être intégrées en complément de la sérologie, dans le suivi de vaccination orale de masse des chiens et ainsi contribuer à diminuer de façon significative l'impact humain énorme qu'a cette maladie négligée dans le monde.

MOTS CLÉS : Rage - Immunité Cellulaire - Vaccination Orale - Chiens - qPCR

Remerciements

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidées pendant l'élaboration de ce projet et la rédaction du mémoire et notamment la Dr Evelyne Picard-Meyer et ma tutrice scientifique Dr Florence Cliquet, pour son intérêt, son soutien et sa confiance.

Merci également au Professeur Canque pour ses remarques pertinentes.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens particulièrement à remercier Dr Sami Darkaoui, Nadia Aboulfida et le Dr Khadija Id Sidi Yahia de l'ONSSA (Rabat, Maroc), qui ont réalisé les manipulations des animaux au Maroc. Votre travail a été exceptionnel.

Un grand merci particulier au Dr Vétérinaire Jacques Barrat, Michel et Nicolas pour leur aide et leur soutien dans les débuts de ce projet. Je ramènerai les croissants, promis! Enfin!

Mille mercis à Marylin Gillet et Audrey Franchi du Département R&D Biologie de VIRBAC™. Vous m'avez rassuré et aidé à poser les bases techniques de mes manipulations.

Une éternelle reconnaissance à Super Karelle (Dr Karelle De Luca) et sa super équipe R&D immunologie de Boehringer Ingelheim™ : Pierre-Yves, Lauriane, Lydie, Manon et Simon... et tout à coup, vous avez été là... et la lumière fut. Je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait et été pour moi, vous ne vous en rendrez jamais compte. Je n'oublierai jamais cette "partie" de décongélations de plus d'une centaine de cryotubes, centri, lavages, numérations etc.. à 6 personnes dans un même labo, s'activant dans une ambiance de rêve rien que pour moi.

Une énorme gratitude à Sylvie, sans toi j'aurais explosé, craqué, laissé tomber...

Un merci éternel à Loutch et GiSan. Sans vous, je ne serais pas ce que je suis maintenant.

Je remercie ma femme qui a toujours cru en moi, plus que moi et a été très patiente dans mes moments d'affreux doutes.

A ma mère, mon socle, mon pilier, tu es toujours, toujours... là quand j'en ai besoin.

A ma soeur ... je t'aime (on se comprend).

A mon père, qui aurait été *fier* et qui m'a aidé d'où il est, à me mettre des «coups de pied au cul» et à relever la tête dans les moments difficiles si nombreux.

A mon fils, qui je l'espère sera inspiré par la réussite au bout de tant de difficultés.

Table des matières

Acronymes	4
Définitions	6
1 Etat de l'art	12
1.1 Le virus de la rage	13
1.2 Physiopathologie de la rage	15
1.3 Généralités sur la réponse immunitaire face à un pathogène	16
1.3.1 La réaction immunitaire innée	16
1.3.2 La réaction immunitaire acquise	17
1.3.3 La mémoire immunitaire	19
1.3.4 La réaction anamnétique	20
1.3.5 Particularité du système nerveux central	20
1.3.6 Pathologie virale	21
1.4 Les stratégies d'échappement du virus de la rage	21
1.5 Historique de la maladie	22
1.6 Vaccination chez l'Homme	23
1.7 Vaccination des animaux domestiques	23
1.8 La vaccination orale de masse des animaux sauvages en Europe	24
1.9 Adaptation de la vaccination orale chez le chien	25
1.10 Problématique	26
2 Hypothèses de travail et objectifs	28
3 Matériels et Méthodes	30
3.1 Approche <i>in vivo</i>	31
3.1.1 Ethique animale	31
3.1.2 Choix du modèle animal	31

3.1.3	Protocole clinique 1 - vaccination par voie parentérale avec un virus inactivé	31
3.1.4	Protocole clinique 2 - vaccination par voie parentérale avec un virus vivant atténué	32
3.1.5	Protocole clinique 3 - vaccination par voie orale avec un virus vivant atténué	33
3.1.6	Méthode de prélèvements sanguins	37
3.2	Approche <i>in vitro</i>	38
3.2.1	Les cellules	38
3.2.2	Les stimulations	44
3.2.3	Les antigènes	45
3.2.4	Les différents protocoles de stimulation mis en application	46
3.3	Approche analytique avec cibles protéiques	48
3.3.1	Le titrage des anticorps neutralisants	48
3.3.2	Diagnostic de rage par immunomarquage direct (FAT) et de particules infectieuses en culture cellulaire (RTCIT)	49
3.3.3	La quantification des protéines par ELISA	50
3.3.4	La quantification des protéines par Luminex	51
3.3.5	La détection de cellules immunitaires répondantes par ELISPOT IFN γ	52
3.4	Approche analytique avec ciblage des transcrits	53
3.4.1	Les principes généraux	53
3.4.2	Choix du gène de référence	56
3.4.3	Extraction	57
3.4.4	Rétrotranscription	58
3.4.5	Conception des amorces	59
3.4.6	Conditions de PCR	61
3.4.7	Construction des standards par clonage	63
3.4.8	Analyse des données brutes de qPCR et détermination des efficacités	66
3.4.9	Mesure de l'expression des gènes	67
3.5	Les analyses statistiques	68
4	Résultats et discussions	70
4.1	Validation de la qPCR	71
4.2	Profil d'expression des cytokines après stimulation polyclonale	74
4.3	Profil d'expression des cytokines après stimulation spécifique	76
4.4	Détection de l'immunogenicité cellulaire antirabique par qPCR	84

4.5	Protocole clinique de vaccination orale (application)	90
5	Conclusions et perspectives	93

Acronymes

ADN Acide Desoxyribo Nucléique.

ADNc ADN complémentaire.

ANSES Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Malzéville, France).

ARN Acide Ribo Nucléique.

ARNm ARN messenger.

BSA Bovine Serum Albumine.

CD Cellule Dendritique.

CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

ConA Concanavaline A.

CPA Cellule Présentatrice d'Antigène.

CRMP2 Collapsin Response Mediator Protein -2.

DMSO DiMethyl SulfOxide.

DO Densité Optique.

ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

FAVN test Fluorescent Antibody Virus Neutralization test.

FCV Calici Virus Félin, de l'anglais «Feline Calici Virus».

GAPDH GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase.

GLN Glutamine.

IFN γ Interféron gamma.

IL-4 Interleukine 4.

ONSSA Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (Rabat, Maroc).

PA Principe actif.

PBMC cellules mononucléées du sang périphérique de l'anglais «Periferal Blood Mononuclear Cell».

PEP Prophylaxie Post-Exposition.

PMA Phorbol 12-Myristae 13-Acetate.

RVNA Rabies Virus Neutralizing Antibodies.

SNC Système Nerveux Central.

SVF Sérum de Veau Foetal.

Définitions

ADNS Système de notification des maladies animales de la commission Européenne (https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/not-system_en).

DALY Espérance de vie corrigée de l'incapacité ou EVI. Mode d'évaluation du coût des maladies mesurant l'espérance de vie en bonne santé c'est-à-dire, en soustrayant à l'espérance de vie, le nombre d'années « perdues » à cause de la maladie, du handicap ou d'une mort précoce. On utilise souvent l'acronyme anglais DALY (pour Disability Adjusted Life Years), le nombre de ces années perdues, comme unité de mesure pour exprimer le résultat.

Epreuve virulente Inoculation d'une dose de virus montrée tuer un animal non vacciné.

PAMP Acronyme anglais pour Pathogen Associated Molecular Patterns. Structure moléculaire partagée par une grande partie de pathogènes, leur composant ou leur structure. En cas de rencontre avec ce pathogène, ils peuvent être reconnus par des récepteurs spécifiques (voir PRR), et déclencher une réaction immunitaire innée. Exemple de PAMP : de l'ARN double brin intracellulaire.

PRR Acronyme anglais pour Pattern Recognition Receptor. Récepteur exprimé par toutes les cellules de l'immunité innée. Membranaires ou cytoplasmiques, ils reconnaissent des structures moléculaires particulières n'existant pas à l'état normal dans l'organisme comme les PAMP (voir PAMP). L'activation de ces récepteurs va déclencher en particulier une phagocytose ou l'activation de la cellule et la mise en place de mécanismes effecteurs.

Titrage Principe de mesure d'une concentration en particules plus ou moins complexes par une méthode basée sur la demi extinction d'un signal (fluorescence, destruction de cellules, mort de souris..) et souvent calculée avec la méthode de calcul de Spearman-Kärber. On peut ainsi titrer des anticorps par exemple par la technique FAVN test, et ainsi exprimer ce titre en «UI/ml». Le titre d'un vaccin sur cellules

peut s'exprimer en «TCID₅₀/ml» et un virus sur souris sera titré en «DL₅₀ IC souris».

Liste des figures

Etat de l'art	12
1.1 Le virion et le génome du virus de la rage.	13
1.2 Arbre phylogénétique du genre Lyssavirus.	14
1.3 Transmission de la rage par morsure.	15
1.4 Déclenchement de la réaction immunitaire innée au niveau des tissus. . . .	16
1.5 Déclenchement de la réaction immunitaire adaptative dans les ganglions lymphatiques.	18
1.6 Chronologie de la réponse immunitaire	19
1.7 Illustration de la rage à l'époque médiévale.	22
1.8 Louis Pasteur et Joseph Meister.	23
1.9 Appats vaccinaux.	25
1.10 Photo d'un chien errant au Maroc.	26
Matériels et Méthodes	30
3.1 Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 1.	32
3.2 Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 2b.	34
3.3 Protocole clinique d'efficacité vaccinale - Schéma	35
3.4 Dilutions du virus d'épreuve.	36
3.5 Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 3.	37
3.6 Caractérisation des cellules par cytométrie en flux	43
3.7 Principe de la réaction de polymérisation en chaine de l'Acide Desoxyribo Nucléique (ADN) (PCR)	55
3.8 Choix des fluorochromes et quencher.	60
3.9 Les différentes phases de l'amplification d'ADN par qPCR.	66
Résultats et discussions	70
4.1 Efficacités sur les plasmides des amorces	71

4.2	Efficacités sur les échantillons des amorces	73
4.3	Etude réponse à la concanavaleine A	74
4.4	Cinétique d'expression des transcrits après stimulation à la concanavaleine A	75
4.5	Caractérisation des cellules de référence.	77
4.6	Réponse cellulaire Th1, de PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé) en ELIS- POT IFN γ après stimulation spécifique.	78
4.7	Expressions en protéines IFN γ et autres cibles, avec la technique Luminex après stimulation spécifique des PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé). . .	79
4.8	Expressions des transcrits de IFN γ et IL-4 en qPCR, après stimulation spécifique des PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé).	80
4.9	Profil d'expression de IFN γ et IL-4 après stimulation avec le PA rage et ConA.	81
4.11	Variation des Ct de GAPDH entre les cellules stimulées et non stimulées .	83
4.12	Réponse cellulaire Th1, de PBMC des protocoles 1 (vaccin inactivé) et 2 (vaccin vivant) en ELISPOT IFN γ après stimulation spécifique.	85
4.13	Expression en protéine	86
4.14	Expression de IFN γ et IL-4 après stimulation de cellules mononucléées du sang périphérique de l'anglais «Periferal Blood Mononuclear Cell» (PBMC) de chiens naïfs ou vaccinés contre la rage avec un vaccin inactivé ou vivant.	88
4.15	Cinétique du taux d'anticorps neutralisant du protocole clinique 3.	91
4.16	Analyse des PBMC du protocole clinique d'efficacité vaccinal.	92

Conclusions et perspectives **93**

5.1	Réponse en IL4 sur les PBMC de chiens vaccinés avec un vaccin vivant. . .	96
5.2	Analyse coûts methodes	96

Annexes **107**

3	Cycle viral du virus de la rage.	108
4	Schéma d'un anticorps	109
5	Boîtes de cryogénéisation de cellules.	109
6	Carte du vecteur pJET1.2/blunt	110
7	Schéma d'une cellule eukaryote.	111
8	Photo des puits de l'essai ELISPOT sur cellules fraîches du protocole cli- nique 1.	112
9	Modèle de courbe obtenu avec les standards IFN γ en ELISA	112
10	Historique des délais de mortalité de chiens avec la souche virale ARIANA 2113	
11	Représentation schématique de l'ARN messenger de IFN γ	113

12	Représentation schématique de l'ARN messenger de IL-4	114
13	Représentation schématique de l'ARN messenger de GAPDH	114
14	Représentation schématique du gène de IFN γ	114
15	Représentation schématique du gène de IL-4	114
16	Représentation schématique du gène de GAPDH	114

Liste des tableaux

Matériels et Méthodes	30
3.1 Composition du milieu complet	42
3.2 Caractéristiques des amorces d'amplification des transcrits	61
3.3 Caractéristiques des Amorces de qPCR	61
Résultats et discussions	70
4.1 Optimisation des concentrations des sondes et amorces de qPCR.	71
4.2 ELISPOT sur cellules de référence - Nombre de spots obtenus - Données brutes	76
4.3 Résultats bruts d'ELISPOT IFN γ après stimulation des cellules d'animaux vaccinés ou naïfs, avec un vaccin inactivé ou vivant.	84
4.4 Résultats des titrages en RVNA par la méthode FAVN test exprimés en UI/mL.	90
Annexes	107
1 Composition du tampon de traitement éliminant les traces d'hématies lors de l'isolement de PBMC.	108

Chapitre 1

Etat de l'art

1.1 Le virus de la rage

LES virus sont des particules infectieuses renfermant leur génome (ADN ou Acide Ribo Nucléique (ARN)) dans une coque protéique elle-même parfois enveloppée d'une membrane cellulaire. Ils sont des parasites obligatoires de leurs cellules cibles car ils ne peuvent pas se multiplier seuls. Ils dérivent la machinerie de la cellule pour réaliser leur cycle de multiplication (voir annexe 3) et s'accumulent, entraînant une paralysie fonctionnelle de cette dernière. A la fin du cycle viral, les virions sortent de la cellule en grande quantité. Les virions libérés vont ensuite parasiter d'autres cellules aux alentours ainsi de suite).

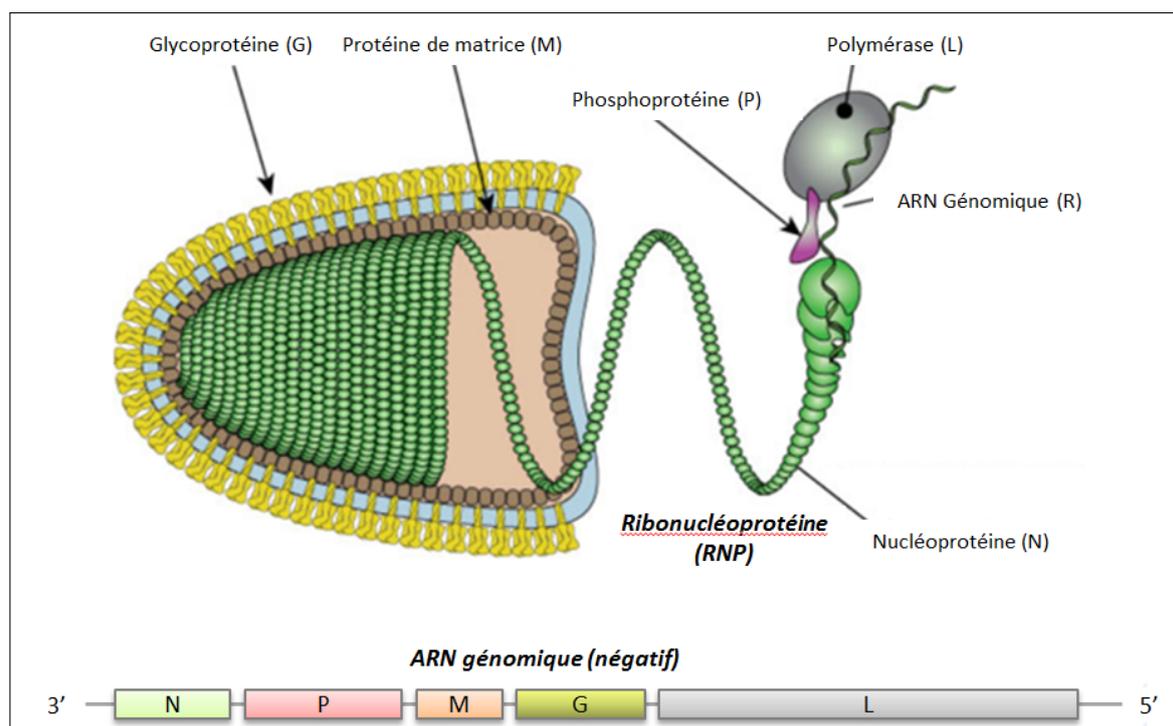


FIGURE 1.1 – Le virion et le génome du virus de la rage. © ViralZone 2017, Swiss Institute of Bioinformatics.

Le virus de la rage (RABV) mesurant environ 130 à 300 nanomètres de long est enveloppé d'une membrane et contient un ARN mono caténaire de polarité négative et donc classé dans l'ordre des Mononegavirales selon l'ICTV (figure 1.1). Il est l'un des principaux membres de la famille des Rhabdoviridae (figure 1.2), et principal représentant du genre Lyssavirus dont les 15 autres espèces (ICTV 2018) (Amarasinghe et al., 2018).

Ils peuvent pour la plupart induire des encéphalomyélites. Les réservoirs et vecteurs principaux peuvent être de petits mammifères, de grands carnivores et des chauves-souris (Rupprecht et al., 2002). D'autres animaux sont des hôtes terminaux et des impasses, comme par exemple les bovins et l'Homme (une seule transmission interhumaine a été

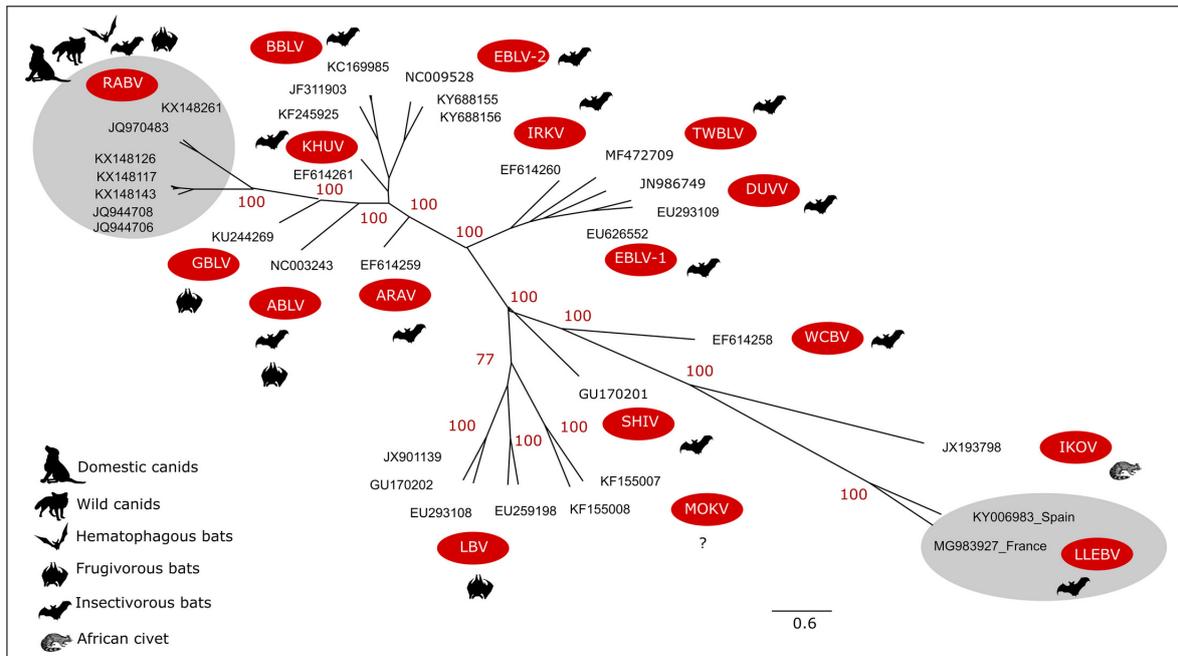


FIGURE 1.2 – **Arbre phylogénétique du genre Lyssavirus.** (Picard-Meyer et al., 2018) Différentes espèces de mammifères sont des hôtes naturels de Lyssavirus. Ces derniers sont la cause d'encéphalopathies mortelles assimilées à la rage. Le virus de la rage RABV est le principale phylogroupe qui touche l'Homme. La récente souche de TWBLV n'est pas encore officiellement reconnue par l'ICTV.

déclarée à ce jour après une greffe de cornée d'un individu infecté (Houff et al., 1979).

Le génome des lyssavirus est long d'environ 11500 pb et est composé de 5 gènes codants pour 5 protéines (figure 1.1) : La nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L) (Wunner et al., 1988). Les protéines P, L et N sont associées à l'ARN au sein du complexe hélicoïdal ribonucléoprotéine (RNP) qui joue un rôle important dans la transcription du génome viral et sa réplication ainsi que dans l'induction de l'immunité cellulaire et humorale (Wunner et al., 1988; Tollis et al., 1991). Le complexe RNP est enveloppé par une enveloppe membranaire incluant la protéine M et la protéine transmembranaire G. La protéine G est une protéine de surface du virion et est capable d'induire des anticorps neutralisants le virus rabique ou Rabies Virus Neutralizing Antibodies (RVNAs) (Benmansour et al., 1991). De plus cette dernière joue un rôle clé dans la pathogénicité du virus en interagissant avec les récepteurs de la cellule, principalement les récepteurs à l'acétylcholine (nAChR) (Hanham et al., 1993; Thoulouze et al., 1998; Lafon, 2005b).

1.2 Physiopathologie de la rage

L'infection est associée à une blessure suite à une morsure par un animal infecté, le plus souvent au niveau des membres (tentative de défense), les enfants étant les premières victimes (OMS, 13 septembre 2018, <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/rabies>). Le virus peut également être transmis par griffure, léchage sur peau excoriée ou sur une muqueuse, ou très rarement lors de greffe d'organe infecté (Houff et al., 1979). Sur ces blessures viennent se déposer des particules virales, présentes dans la salive de l'animal infecté, dans le tissu musculaire.

RABV, comme tous les Lyssavirus est neurotrope et infecte le système nerveux périphérique au niveau de la blessure (figure 1.3). Le virus est transporté de façon rétrograde jusqu'à la racine du ganglion dorsal où la réplication virale est explosive et devient détectable (Johnson, 1965). La durée de cette phase est variable dans le temps mais peut être extrêmement rapide. Les particules virales peuvent se disséminer de façon centrifuge au système nerveux autonome et les glandes périphériques (salivaires, surrénales, lacrymales). Ainsi l'animal contaminé peut infecter d'autres mammifères par un contact avec la salive (Dietzschold et al., 2008). Dans le modèle murin d'infection, une amputation du nerf sciatique suite à une inoculation virale à une patte arrière, peut prévenir le développement de la maladie (Baer et al., 1965). On a mesuré la vitesse de déplacement chez le rat dans des cellules neuronales en culture entre 12 et 24mm/jour (Lycke and Tsiang, 1987). Chez l'Homme, ce temps entre l'exposition et le développement de la maladie (qui correspond à la période d'incubation) peut être mesuré en mois (un à trois mois en général), parfois en années dans de très rares cas.

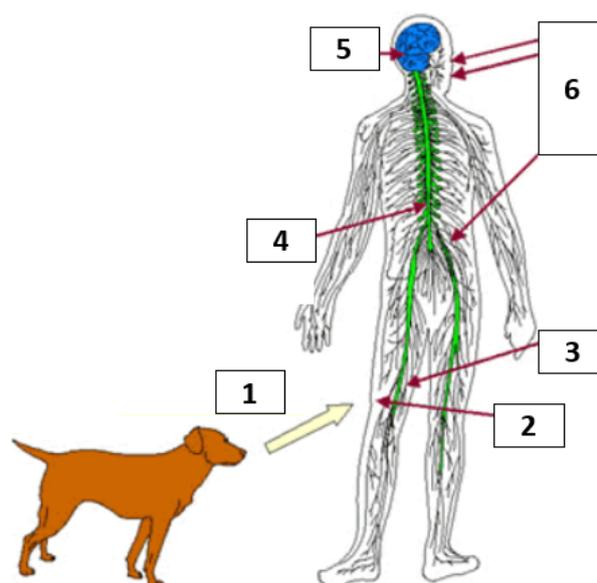


FIGURE 1.3 – **Transmission de la rage par morsure.** **1** : Entrée du virus via une morsure ; **2** : Réplication du virus dans les muscles du site de morsure ; **3** : Les virus infectent le système nerveux périphérique et progressent par transport rétrograde axonal ; **4** : Les virus se répliquent dans les ganglions des racines dorsales et voyagent via la moelle épinière jusqu'au cerveau, apparition des premiers symptômes ; **5** : Infection du cerveau ; **6** : Les virus voyagent du cerveau via les nerfs vers d'autres tissus comme les yeux, les glandes salivaires, les reins.

Arrivé dans le Système Nerveux Central (SNC), une infection à RABV cause des dys-

fonctionnements neuronaux entraînant selon les espèces : agressivité exacerbée, hydrophobie, délires, convulsions, paralysie et coma. Après l'apparition des premiers symptômes, la mort est inévitable (Lafon, 2011).

1.3 Généralités sur la réponse immunitaire face à un pathogène

1.3.1 La réaction immunitaire innée

Les cellules sentinelles sont des cellules immunitaires qui résident en permanence principalement dans les tissus comme les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (CD) (ces dernières circulent également dans le sang, la lymphe, les muqueuses et les organes lymphoïdes), à l'état basal (homéostasie).

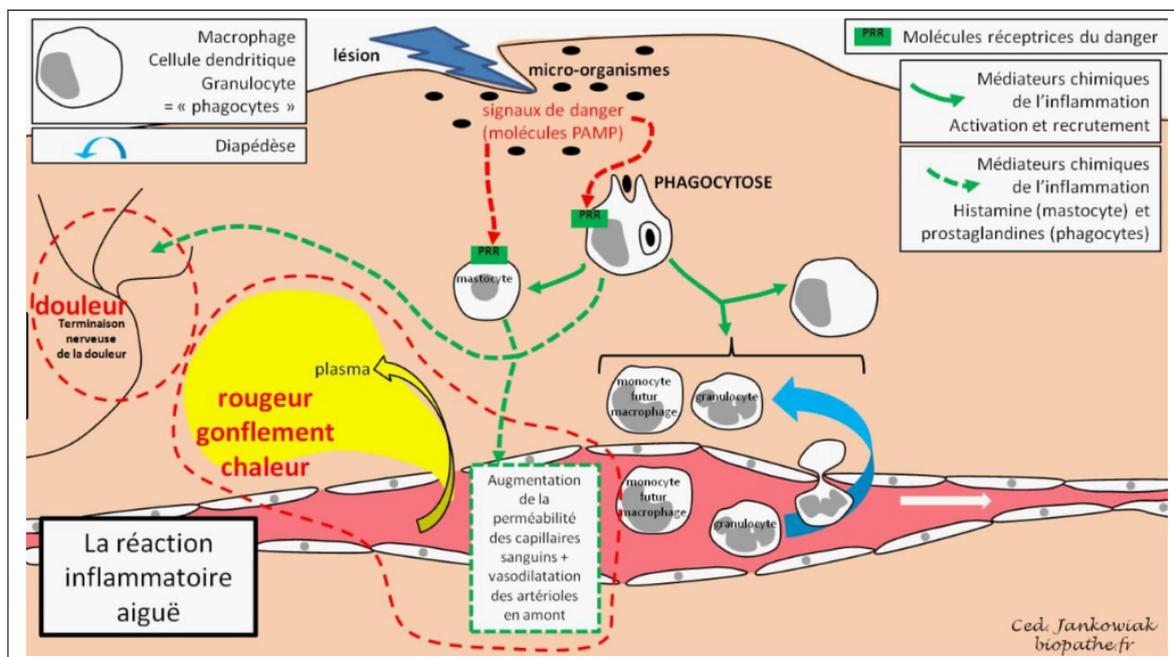


FIGURE 1.4 – Déclenchement de la réaction immunitaire innée au niveau des tissus. Les cellules sentinelles sont des cellules immunitaires qui résident en permanence principalement dans les tissus comme les mastocytes, les macrophages et les CD en homéostasie. Elles expriment sur leur membrane des récepteurs de l'immunité innée. Une fois activées en cas d'intrusion, elles vont alors phagocyter les organismes étrangers puis les digérer. Elles libèrent alors des médiateurs chimiques qui vont d'une part provoquer une vasodilatation des vaisseaux sanguins proches (d'où gonflement et douleur) augmentant la perméabilité vasculaire, et vont faciliter la diapédèse des globules blancs dont elles augmentent le recrutement (d'où rougeur et chaleur). Cette réaction inflammatoire, va être à l'origine de l'immunité acquise portée par les lymphocytes T et B (source : biopathe.fr licence creative commons)

Elles expriment sur leur membrane des récepteurs de l'immunité innée (PRR) très conservés par l'évolution. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires généraux communs aux microorganismes (PAMP) comme des composants de la paroi ou de la membrane des bactéries ou des champignons, protéines virales, molécules libérées en cas de lésion etc.

Une fois les récepteurs activés en cas d'intrusion, ces cellules vont phagocyter (internaliser) les organismes étrangers puis les digérer (lyser). Elles libèrent alors des médiateurs chimiques dont l'histamine, les prostaglandines et les cytokines pro-inflammatoires qui vont, d'une part provoquer une vasodilatation des vaisseaux sanguins proches augmentant la perméabilité vasculaire, d'autre part vont faciliter le passage des globules blancs dont elles augmentent le recrutement du sang vers la lésion à travers les parois sanguines (diapédèse) (voir figure 1.4).

Parmi les globules blancs, on retrouve les neutrophiles, les granulocytes et les monocytes qui vont alors s'activer en macrophages et phagocyter les microorganismes libres. Des lymphocytes tueurs naturels (NK) vont être également recrutés et détruire les cellules infectées par un virus par exemple, l'empêchant de se répliquer.

Parfois cette réponse innée très rapide et efficace suffit pour éliminer un pathogène de l'organisme. Selon la rapidité de réplication, la quantité de particules présentes et les stratégies plus ou moins complexes d'échappement à ce système, une réaction (plus longue à se mettre en place) plus efficace car plus spécifique, est nécessaire et est déclenchée : l'immunité acquise.

Les macrophages et les CD vont exprimer à leur surface une grande quantité de protéines de surface, les récepteurs du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe 1 et 2 (marqueur du soi). Ceux-ci seront couplés aux peptides provenant de la digestion du microorganisme. Les CD vont alors migrer et partir dans la circulation jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate etc..) ([Krummel et al., 2016](#)).

1.3.2 La réaction immunitaire acquise

Dans les ganglions lymphatiques, les Cellule Dendritique (CD) vont rencontrer des lymphocytes B (LB) naïfs dans le cortex, et leur présenter des peptides (ou antigènes) à leur surface, que les LB vont reconnaître via leurs récepteurs BCR. Les CD vont également rencontrer des lymphocytes T (LT) naïfs et leur présenter les complexes CMH-peptides Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) que les LT vont reconnaître via leurs récepteurs TCR (les LTc vont reconnaître le complexe CMH1-peptide et les LTh le complexe CMH2-peptide) ([Chaplin, 2010](#)).

Les meilleurs candidats vont alors être sélectionnés (class witch) et s'activer via plu-

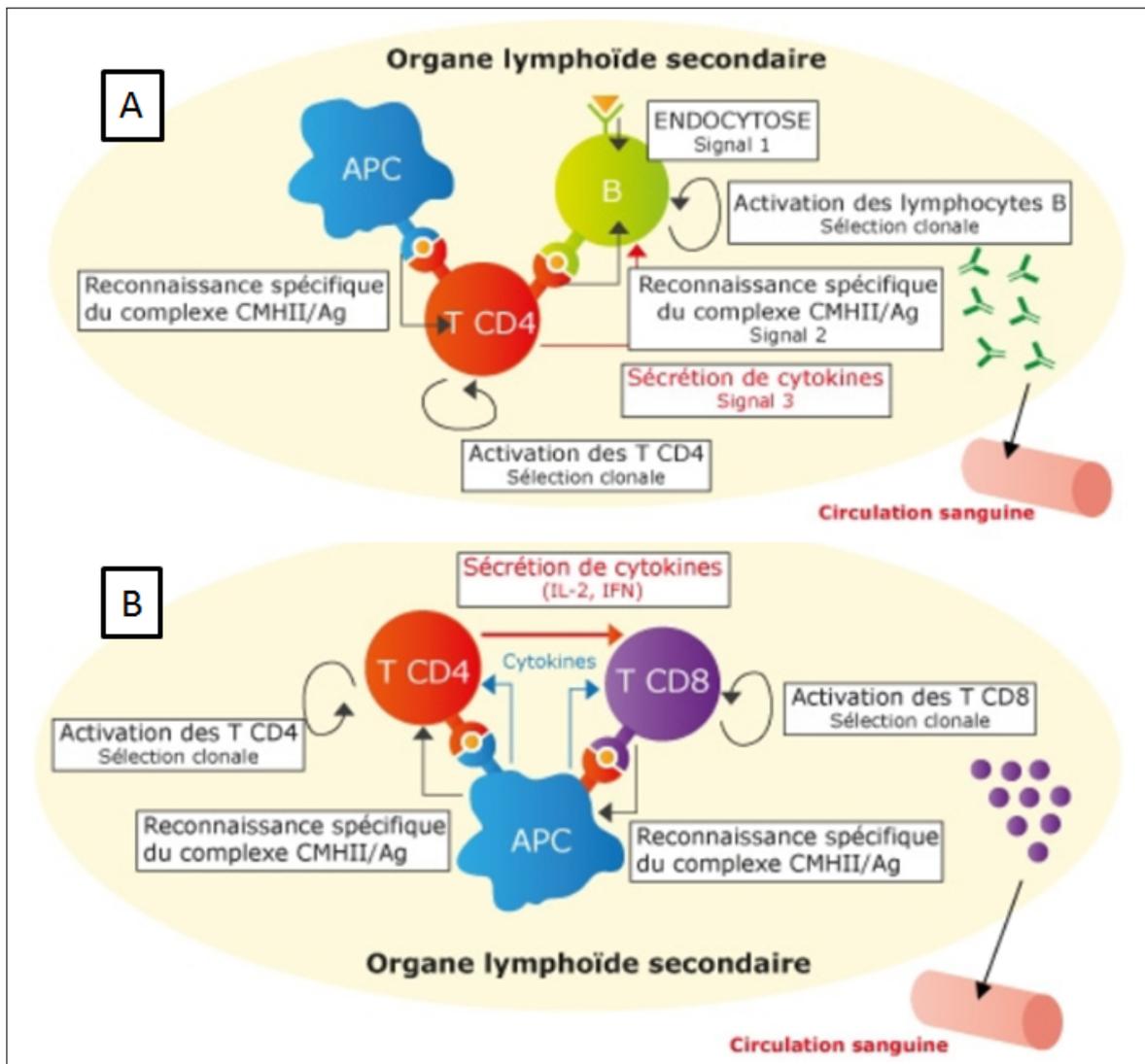


FIGURE 1.5 – Déclenchement de la réaction immunitaire adaptative dans les ganglions lymphatiques. **A** : Les cellules dendritiques présentent l'antigène (CPA) aux LT et aux LB qui sont sélectionnés dans ces ganglions pour reconnaître au mieux les peptides présentés. **B** : Les cellules dendritiques ayant rencontré le pathogène présentent à leur surface des peptides provenant de sa digestion, soit directement soit complexé à des molécules du CMH (marqueur du soi). Source iconographique © Maxicours by Educlever 2019.

seurs signaux (figure 1.5). Ils vont se multiplier (expansion clonale) puis partir dans la circulation, attirés par les cytokines exprimées par les cellules de l'immunité innée. Les LT auxiliaires (LTh) vont orchestrer ce mécanisme complexe en sécrétant divers types de cytokines. Les LTh1 vont sécréter entre autre de l'IFN γ et de l'interleukine 2 (IL2) ce qui va activer les LT cytotoxiques (LTc), qui vont, à l'instar des NK mais de façon très spécifique, donc plus efficace, détruire les cellules infectées. Une sécrétion de IL-4 par les LTh2 va entraîner la maturation des LB en plasmocytes qui vont sécréter dans le sang des anticorps neutralisants (VNA dans le cadre d'une reconnaissance virale) en très

grande quantité. Ces derniers vont, comme leur nom l'indique, se fixer directement sur les particules infectieuses et les neutraliser. Ce complexe sera phagocyté ensuite.

Les LB vont également pouvoir reconnaître directement le pathogène et le phagocyter pour jouer un rôle de CPA auprès des LTh d'où une coactivation.

On appelle immunité à médiation cellulaire l'immunité acquise portée par les LT, et immunité à médiation humorale, celle portée par les plasmocytes et les anticorps.

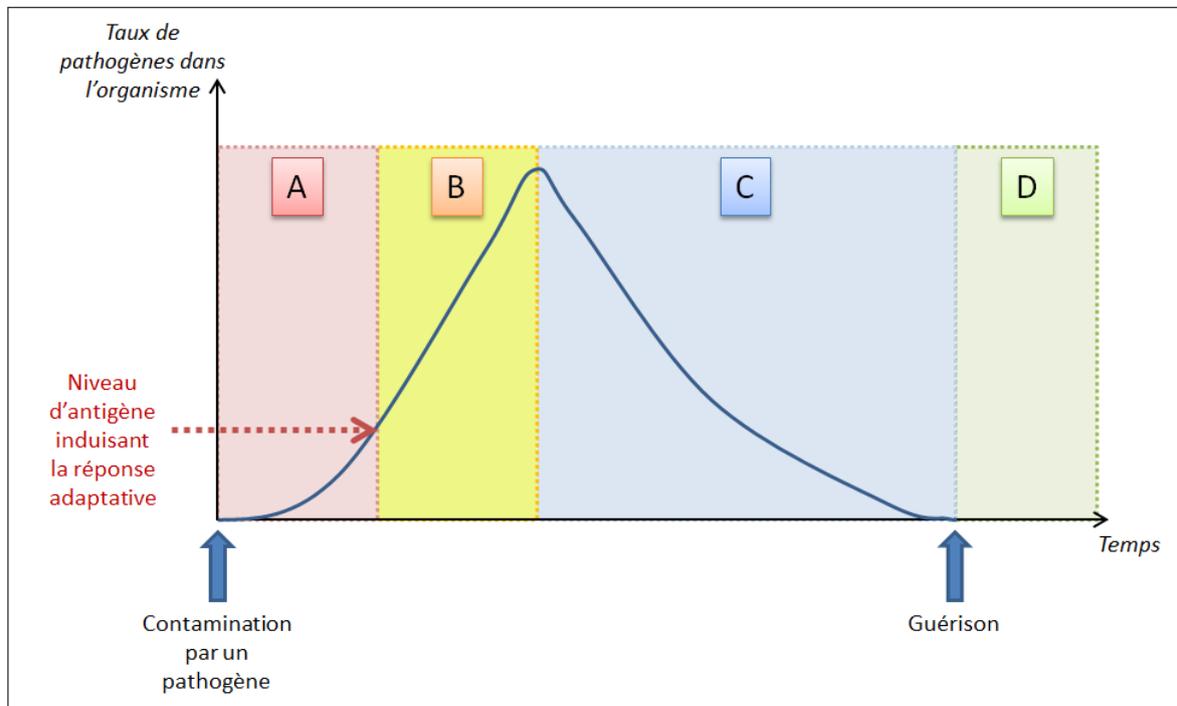


FIGURE 1.6 – **Chronologie de la réponse immunitaire suite à la contamination d'un mammifère par un pathogène.** A : Infection, réaction innée en cours. B : Initiation de la réponse adaptative. C : Réponse adaptative, attaque spécifique et massive du système immunitaire contre le pathogène. D : Mémoire immunologique.

1.3.3 La mémoire immunitaire

La réaction immunitaire est enfin freinée lors de la disparition des antigènes, et des boucles de rétrocontrôles cytokiniques induisent la mort des effecteurs cellulaires. Cependant, une partie de lymphocytes T et B activés survivent, induisant le phénomène de mémoire. Les LT et LB mémoires resteront présents de nombreuses années dans les organes lymphoïdes secondaires et en minorité dans la circulation sanguine.

Les RVNA sécrétés, sont très stables et peuvent perdurer des années dans la circulation sanguine.

Les marqueurs de l'immunité acquise cellulaire et humorale sont donc des sentinelles en cas de nouvelle rencontre avec le même pathogène (Bonilla and Oettgen, 2010).

La figure 1.6 synthétise les différentes phases de la mise en place de la réponse immunitaire consécutive à une infection.

1.3.4 La réaction anamnestic

Il s'agit de la réaction immunitaire secondaire suite à une nouvelle introduction de l'antigène (sur laquelle a été fondée le principe de la vaccination).

La réaction innée se déclenche alors rapidement de la même façon que la première fois. Par contre les VNA vont directement neutraliser les particules infectieuses reconnues ainsi que les peptides présentés par les cellules infectées. Les NK vont reconnaître les parties Fc des anticorps (figure 4 en annexe), et détruire plus rapidement ces dernières. Les CPA vont activer les LT mémoires qui vont se réactiver très rapidement et effectuer directement l'expansion clonale, et sécréter des cytokines amplifiant le mécanisme. Cette réaction décrite précédemment sera cette fois-ci explosive, on parle de réaction anamnestic. Elle permet une élimination efficace de pathogène souvent asymptomatique pour le mammifère concerné.

1.3.5 Particularité du système nerveux central

Le SNC est un site privilégié de la réponse immunitaire. Il existe des spécificités du contrôle de la réponse immune dans le SNC d'origine anatomique, cellulaire et moléculaire. Sur le plan anatomique, la barrière hémato-encéphalique et l'absence d'un drainage lymphatique classique sont responsables d'un isolement relatif du SNC. Sur le plan cellulaire et moléculaire, les cellules présentes au sein du SNC sont dépourvues de molécules du CMH de classe II en condition normale (Lau and Joly, 2001).

Il existe au sein du SNC un ensemble de molécules participant à la régulation immunitaire, qu'elles soient solubles ou présentes sur les membranes, des cellules. Des facteurs solubles comme TGF- β et IL10, sécrétés par la microglie (cellules immunitaires de type macrophage, présents dans le SNC), participent à l'immuno-dépression naturelle du SNC en diminuant l'expression des molécules de classe II comme la prolifération des LT et LB. Il est à noter que les cellules du SNC expriment certains marqueurs comme fas ligand, capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T pénétrant dans le SNC, et participent ainsi à la régulation de la réaction inflammatoire (Berthelot and Laplaud, 2008).

Les cellules de l'immunité acquise, activées en périphérie, ont la possibilité de traverser activement cette barrière. Chez l'Homme, les lymphocytes sélectionnés spécifiquement et activés expriment CD69 (cluster de différenciation, qui est une protéine transmembranaire) et circulent dans le système lymphatique et le sang périphérique (Lafon, 2005a; Roy

and Hooper, 2007). Ils sécrètent des molécules qui vont faciliter leur passage à travers la barrière encéphalo-rachidienne (Bailey et al., 2006). Chez la souris, le recrutement et la motilité des lymphocytes sont amplifiés par la Collapsin Response Mediator Protein -2 (CRMP2), une molécule sécrétée par les neurones dans le SNC (Vuailat et al., 2008).

En résumé, le SNC est relativement isolé de la circulation périphérique ce qui entraîne une immunité particulière localement, excluant une réaction inflammatoire trop importante qui pourrait endommager les cellules nerveuses dépourvues de pouvoir régénérant en général. Les cellules de l'immunité acquise activées par un antigène en périphérie, sont par contre capables d'ouvrir la barrière et d'entrer pour agir dans le SNC d'une façon très spécifique.

1.3.6 Pathologie virale

La réaction immunitaire est le cadre d'une bataille de l'organisme face à un pathogène qui a été sélectionné dans le temps par l'acquisition de mécanismes d'échappement au système immunitaire. Les virus sont passés maîtres dans ces stratégies, chacun ciblant une partie de ce rouage complexe qui, déstabilisé, peut entraîner une perte de contrôle et donner l'avantage au pathogène. Parfois même le système immunitaire dérégulé entraîne des dysfonctionnements physiologiques allant jusqu'à la mort.

Suivant la quantité de virus pénétrant l'organisme, sa qualité (plus ou moins pathogène), sa nature (plus ou moins rapide) etc., l'issue sera favorable soit pour l'organisme, soit pour le virus.

1.4 Les stratégies d'échappement du virus de la rage

Lors d'une infection par RABV, celui-ci, dans les premiers stades, bloque sa phagocytose par les cellules dendritiques. De ce fait, sa digestion et la présentation d'antigènes aux LT est faible voire inexistante inhibant ainsi indirectement leur activation (Yang et al., 2015).

Il a été montré une infection des macrophages par le virus. Ces derniers vont relarguer différentes molécules dont du monoxyde d'azote qui inhibe les cellules NK (Nazé et al., 2013). La réaction inflammatoire est ainsi diminuée (Nakamichi et al., 2004), ce qui permet au virus de s'échapper dans les neurones où, comme dit précédemment, celui-ci va migrer jusqu'au SNC de façon discrète, pendant un certain temps.

Arrivé dans le SNC, il va se répliquer de façon explosive (voir le cycle de réplication en annexe 3).

On retrouve chez les souris moribondes des quantités faibles de cytokines et chimiokines ([Appolinário et al., 2016](#)) permettant la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.

Le rôle clé des LT dans la communication avec les LB, et ainsi la réponse à médiation humorale, est démontré. En effet, les animaux qui succombent, développent peu ou pas d'anticorps neutralisant ([Gnanadurai et al., 2013](#); [Miao et al., 2017](#)).

Le virus n'entraîne pas non plus la destruction des cellules neuronales hôtes mais des dysfonctionnements par des changements de forme des axones et dendrites ([Lafon, 2005a](#)), ce qui peut expliquer les signes cliniques associés à la maladie ([Kammouni et al., 2015](#)) ([Liu et al., 2017](#)).

Le virus a ainsi le temps de s'échapper de façon centrifuge vers les glandes salivaires et passer, par un comportement agressif de l'animal infecté, et à la faveur de blessures infligées à un animal sain, à un nouvel hôte lui permettant ainsi de se perpétuer ([Dietzschold et al., 2008](#)).

1.5 Historique de la maladie

Cette maladie est connue depuis l'antiquité et a fait la mauvaise réputation en Europe, encore aujourd'hui, des carnivores sauvages dont le loup et surtout le renard, qui en sont ici les principaux vecteurs pour l'Homme (figure 1.7).



FIGURE 1.7 – **Illustration de la rage à l'époque médiévale.** Illustration du canon d'Avicenne, littérature Perse médiévale

Aujourd'hui plus de 95% des morts humaines sont dues au chien et ce, dans les pays en développement. Ainsi chaque année, en moyenne, environ 59000 personnes à travers le monde décèdent de la rage ([Hampson et al., 2015](#)). Il n'existe à l'heure actuelle, dès lors que les signes cliniques sont déclarés, aucun traitement contre ce pathogène.

Le cas le plus récent nous concernant est en 2017, un petit français ayant joué avec un chien inconnu lorsqu'il était en vacances avec ses parents au Sri Lanka. De retour en France, il n'a pas survécu aux symptômes décrits précédemment, apparus quelques jours après son retour. Ce drame aurait pu être évité s'il avait reçu, rapidement après contact avec ce chien, une Prophylaxie Post-Exposition (PEP), c'est-à-dire l'administration de vaccin et d'immunoglobulines.

1.6 Vaccination chez l'Homme

En effet comme vu précédemment, le temps durant lequel le virus voyage caché dans les neurones périphériques vers le SNC, est une fenêtre d'opportunité pour pouvoir développer, après une exposition au virus, une immunité suffisante grâce à un vaccin atténué ou inactivé, administré au plus tôt après l'infection.

C'est Louis Pasteur en 1885 qui a découvert cette stratégie et l'a expérimentée avec succès grâce à un virus atténué obtenu par plusieurs passages sur lapins, sur le petit Joseph Meister qui avait été mordu par un chien infecté, qui est le premier de l'histoire à avoir été sauvé d'une telle exposition au virus (figure 1.8).



FIGURE 1.8 – **Louis Pasteur et Joseph Meister.** Ce dernier étant la première personne de l'histoire à avoir été sauvée par une vaccination post-exposition.

En 2015, 3 millions de personnes recevaient avec succès une prophylaxie post-exposition. Annuellement dans le monde, la rage canine est la cause de plus de 3.7 millions d'années de vie ajustée sur l'incapacité DALY perdues, et 8.6 milliards de US\$ de pertes économiques (Hampson et al., 2015).

Les vaccinations préventives et le PEP sont très efficaces pour protéger les Hommes, mais elles coûtent très cher (WHO Expert Consultation on Rabies and Weltgesundheitsorganisation, 2018; Shim et al., 2009) et ne sont que peu disponibles, dans les pays en voie de développement qui sont les plus touchés.

La rage a été longtemps une maladie négligée mais depuis peu, l'OMS, l'OIE et la FAO, ont pris des engagements pour un objectif de zéro cas humains d'ici à 2030 grâce à une vision globale active du programme « une seule santé » (Zer, 2017) et un plan pluriannuel.

1.7 Vaccination des animaux domestiques

La vaccination des animaux domestiques (chiens et chats le plus souvent), permet dans les pays concernés par la rage vulpine (Europe) ou véhiculée par les animaux sauvages (USA par exemple) de les protéger d'une infection par un animal infecté. Ces mesures permettent indirectement de protéger l'Homme, qui est en contact permanent avec les carnivores domestiques. La plupart des pays industrialisés touchés par la rage sylvatique imposent la vaccination des carnivores domestiques. En revanche, les pays indemnes de

rage ne la rendent généralement pas obligatoire.

Au niveau technique, des méthodes de titrage d'anticorps neutralisants comme le test de neutralisation d'anticorps neutralisant par fluorescence Fluorescent Antibody Virus Neutralization test (FAVN test) (Cliquet et al., 1998) permettent de doser ces derniers dans le sérum. Un titre de 0,5 UI/mL est considéré par l'OMS (WHO, 1992) comme le niveau minimal de protection des anticorps c'est-à-dire qu'au-dessus de ce seuil, le virus est complètement neutralisé par les anticorps antirabiques, le sujet vacciné est considéré comme protégé contre la rage.

1.8 La vaccination orale de masse des animaux sauvages en Europe

La vaccination orale à l'aide d'appâts contenant un virus vivant, a émergé graduellement à la fin des années 1970 comme la seule méthode pour protéger les animaux sauvages contre le virus rabique (renards et chiens viverrins sont les réservoirs du virus en Europe). Les premières campagnes de vaccination orale de la faune sauvage ont eu lieu en Suisse en 1978 (Wandeler et al., 1988), puis d'autres pays ont emboîté le pas comme la France grâce au laboratoire de la rage de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Malzéville, France) (ANSES), le Luxembourg, la Belgique et l'Allemagne. Avec l'élargissement de l'UE et les mesures de co-financement de la CE adoptées dès 1989, progressivement l'ensemble des pays de l'UE a mis en place des programmes de vaccination orale de la faune sauvage. Le succès de ces programmes est tel qu'en 2017 et en 2018, moins de 10 cas de rage sont recensés dans l'UE, contre des milliers de cas il y a quelques années selon le ADNS. La CE entrevoit que l'UE n'enregistrera plus de cas de rage d'ici 2020.

Certains vaccins ont été utilisés en France après avoir été étudiés en laboratoire sur renard et chien viverrin pour leur immunogénicité, innocuité et efficacité. En effet SAG2[®] (VIRBAC[™]) (Lafay et al., 1994) qui est un virus rabique atténué moléculairement par deux mutations stables et VRG[®] (MERIAL[™]), qui est un virus de la vaccine exprimant une glycoprotéine rabique recombinante, protègent les animaux vaccinés d'une épreuve virulente. Pour ce qui est de l'immunogénicité, les animaux développent une immunité humorale importante avec un pic d'anticorps neutralisant vers 14 jours, le taux diminuant à un plateau toujours supérieur à 0,5 UI/mL jusqu'à 180 jours après vaccination (Lambot et al., 2001; Blanton et al., 2007; Cliquet et al., 2013).

Le mélange liquide vaccinal est contenu dans une capsule ou un petit sachet enrobé d'une pâte étudiée pour son appétence pour les animaux cibles. Cette pâte constitue

l'appât qui contient également un biomarqueur de prise, la tétracycline. Les appâts sont distribués à large échelle par hélicoptère ou avion deux fois par an dans les zones infectées.

Après distribution, un suivi est indispensable pour mesurer l'efficacité de la campagne de vaccination grâce à des indicateurs sur des animaux collectés dans les zones vaccinées. Ces derniers comprennent (i) une recherche de biomarqueur post-mortem au niveau des dents (tétracycline) indiquant le contact des muqueuses avec l'appât vaccinal, (ii) la quantification des anticorps démontrant une réponse adéquate à l'immunisation (contact avec le liquide vaccinal).

Ce dernier critère est important à plus d'un titre. D'une part, il permet de viser une couverture de protection de plus de 70% de la population qui est indispensable pour casser le cycle de transmission du virus dans une population (Voigt et al., 1985). D'autre part, il montre l'efficacité des actions entreprises aux financeurs. En effet, une campagne de vaccination coûte très cher (Masson et al., 1999) et il convient de faire un retour coût/bénéfice, sur chaque action entreprise.



FIGURE 1.9 – **Appâts vaccinaux oraux pour la faune sauvage d'Europe ayant été utilisés en France notamment.** Constitués d'un enrobage et d'une capsule contenant le vaccin. Au dessus un appât contenant un vaccin VRG[®] (Merial[™]), au dessous deux appâts contenant un vaccin SAG2[®] (VIRBAC[™]). Source : <http://www.ententeragezoonoses.com>

1.9 Adaptation de la vaccination orale chez le chien

Comme exprimé précédemment, le principal réservoir de la rage dans le monde à l'origine de la quasi totalité des cas humains, est aujourd'hui le chien. L'OMS et l'OIE recommandent la mise en place de campagnes de vaccination parentérale de masse des chiens en Afrique et en Asie, qui ont prouvé leur efficacité et aussi ont montré un rapport coût/bénéfice intéressant (OMS, 2018 ; OIE, 2018).

Toutefois, toutes les populations de chiens ne sont pas accessibles (photo 1.10), et une vaccination à grande échelle (indispensable), n'est possible qu'à l'aide de la vaccination orale qui est recommandée par différents experts. Celle-ci devrait être utilisée en complément de la vaccination parentérale, afin d'augmenter la couverture vaccinale des chiens



FIGURE 1.10 – **Chien errant au Maroc.** Les chiens dans les pays en voie de développement sont responsables de 95% des morts humaines dues à la rage (source GARC).

(Cliquet et al., 2018).

On a vu précédemment que les anticorps séroneutralisants sont des effecteurs critiques dans l'élimination du virus et sont généralement corrélés avec une protection des animaux (à hauteur de 0,5 UI/mL). Il a été constaté dans plusieurs études, une résistance à un virus d'épreuve virulente chez certains chiens vaccinés, malgré un niveau faible, voire indétectable d'anticorps après vaccination avec SAG2 (Cliquet et al., 2007), VRG (Rupprecht et al., 2005; Cliquet et al., 2008) et différents vaccins à virus rabique recombinants (Rupprecht et al., 2005).

1.10 Problématique

Il est difficile à ce jour de réaliser un suivi sur le terrain de la couverture vaccinale des chiens par voie orale. Il s'agit là d'un frein dans l'adaptation de la méthode avec des vaccins pourtant efficaces et qui font encore actuellement leurs preuves sur le terrain.

En effet, les chiens vaccinés oralement, contrairement aux renards, montrent des taux d'anticorps neutralisants faibles, voire presque nuls (Cliquet et al., 2018), alors qu'ils sont protégés contre la rage.

La cause de l'absence d'anticorps neutralisant détectables par les techniques actuelles et corrélés à une protection contre un virus d'épreuve virulente n'est pas connue. On a vu que l'immunité humorale n'était qu'une petite partie du mécanisme complexe mis en place lors d'une immunisation avec un pathogène. L'immunité cellulaire en effet, est indispensable dans l'orchestration de la réponse à une infection et donc, son intégrité est corrélée à une certaine protection de l'animal face au virus, ainsi qu'à la mise en place d'une mémoire immunitaire. Elle est une des premières lignes de défense en cas de réponse anamnétique en stimulant les cellules NK via une sécrétion rapide d'IL2 (Horowitz et al., 2010).

Une étude de 1985 sur chiens vaccinés avec un virus atténué par voie intramusculaire,

a montré une corrélation entre une augmentation (jusqu'à 28 jours après vaccination avec un pic entre 7 et 14 jours) de la quantité d'ADN néoformé (augmentation de thymidine tritiée) dans les PBMC, stimulées *in vitro* par un antigène rabique, et la survie à une épreuve virulente des animaux. De plus on ne retrouve pas ce signal dans le groupe de chiens non vaccinés, ceux-ci succombant à la même épreuve (Gerber et al., 1985).

Des chercheurs ont montré récemment une réponse spécifique IFN γ après vaccination antirabique (vaccin inactivé, par voie parentérale) par ELISPOT (Chapat et al., 2017) 65 jours post-vaccination. Cette technique simple permet de mesurer le nombre de clones répondants à une stimulation spécifique *in vitro*.

L'IFN γ semble une cible intéressante dans cette problématique vu l'importance de sa présence dans les mécanismes de protection contre le virus RABV. Cette cytokine étant sécrétée principalement par les lymphocytes T CD4 TH1, et ceux-ci se retrouvant dans la circulation sanguine après une première rencontre avec un virus atténué, c'est une molécule clé pouvant révéler la présence de clones spécifiques (Katz et al., 2017).

Il se peut que d'autres marqueurs immunologiques soient révélés dans le cas d'un animal protégé ne présentant pas d'anticorps. Une étude sur le renard a montré une sur-expression spécifique de transcrits d'IFN γ et de IL-4 par PCR, chez la majorité des animaux vaccinés 195 jours après vaccination par voie orale, avec SAG2 et VRG, surexpression que l'on ne montre pas chez les animaux naïfs (Lambot et al., 2001). La PCR est une méthode intéressante car elle permet de cibler facilement plusieurs transcrits dans une même cellule.

L'objectif ultime serait pour les chercheurs, de bénéficier d'une méthode permettant d'appréhender la réponse immunitaire cellulaire de chiens vaccinés par voie orale.

Chapitre 2

Hypothèses de travail et objectifs

Le but de mon projet est de corrélérer la réponse cellulaire chez le chien à la vaccination à l'aide d'un vaccin vivant atténué (SAG2[®]) par voie orale.

La méthode choisie est la qPCR qui sera mise au point au préalable pour mesurer les expressions de IFN γ et IL-4.

Dans un premier temps, nous allons mettre au point une qPCR amplifiant les cibles IFN γ , IL-4 et un gène de référence. Dans ce sens nous construirons un plasmide intégrant un transcrite pour chaque cible et caractériserons chaque qPCR pour les valider.

Dans un deuxième temps, nous mesurerons l'expression de ces transcrits sur PBMC après activation *in vitro* avec cette technique. On réalisera alors une étude réponse avec un antigène polyclonal, sur des PBMC dont on mettra l'isolement, la congélation et la décongélation en place. Cette mise en place au laboratoire de l'ANSES sera complétée par un stage chez la société VIRBAC (Carros, France).

Ensuite, nous utiliserons cette dernière méthode pour montrer l'immunisation effective de chiens après vaccination antirabique de façon parentérale, avec un vaccin inactivé et un vaccin vivant atténué. Pour ce faire, on validera notre méthode avec l'ELISPOT après un stage chez la société Boehringer Ingelheim (Lyon, France).

Finalement, les méthodes validées devront être éprouvées dans le cadre d'un protocole clinique d'efficacité vaccinale avec un vaccin antirabique vivant atténué par voie orale sur des chiens tout venant. Pour cela on mettra en place un tel protocole dans un pays touché par la rage, le Maroc par exemple en collaboration avec le laboratoire de l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (Rabat, Maroc) (ONSSA). Les échantillons seront traités au laboratoire de l'ANSES après envoi.

Chapitre 3

Matériels et Méthodes

3.1 Approche *in vivo*

3.1.1 Ethique animale

Tous les protocoles cliniques ci-après ont été réalisés dans le respect des règles de l'éthique animale et ont fait l'objet d'une demande d'autorisation à un comité d'éthique.

3.1.2 Choix du modèle animal

Le modèle animal choisi pour les mises au point est le chien. En effet, les outils moléculaires utilisés sont spécifiques à une espèce animale. La problématique étant la réponse immunitaire du chien, nous ne pouvions que mettre au point les outils sur ce modèle.

3.1.3 Protocole clinique 1 - vaccination par voie parentérale avec un virus inactivé

Toutes les manipulations des animaux du protocole 1 ont été faites par des techniciens animaliers de chez Boehringer Ingelheim® (Lyon, France) sous la supervision du Dr Karelle De Luca.

Les animaux

Il s'agit de 6 chiens beagles mâles et femelles, âgés de 4 à 5 mois.

Protocole de vaccination

Le vaccin RABISIN® (Boehringer Ingelheim®, LYON, FRANCE) est un vaccin anti-rabique inactivé à la betapropiolactone et contenant un adjuvant (Minke et al., 2009).

Quatre animaux ont été vaccinés par voie intramusculaire avec du vaccin RABISIN® (MERIAL®, LYON, FRANCE), deux avec le lot 4RBN5B021 et deux avec le lot 4RBN5A011.

Les deux animaux contrôles ont reçu de la même façon, 2 mL de PBS.

Prélèvements sanguins

Un prélèvement de sang sur les six animaux, a été effectué 35 jours après vaccination, pour isolement de PBMC voir section 3.2.1 page 38).

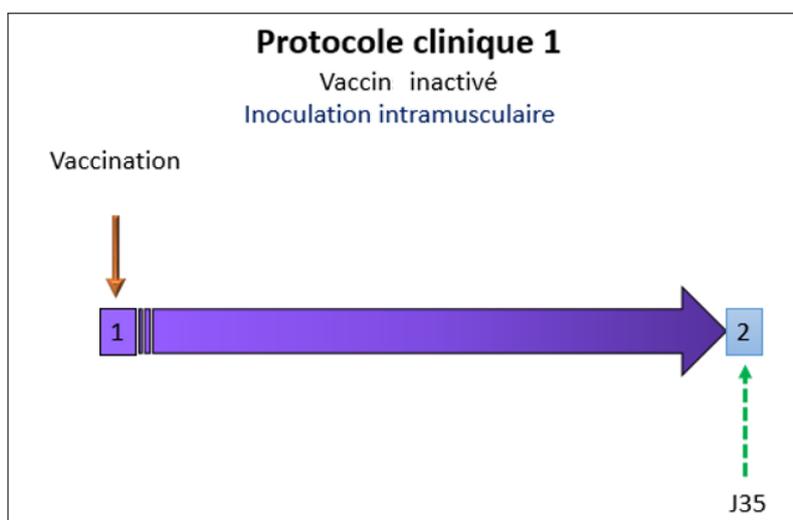


FIGURE 3.1 – Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 1. **1** : Vaccination de quatre animaux avec un vaccin inactivé Rabisin par voie intramusculaire, deux autres animaux ont reçu par voie intramusculaire, 2 mL de PBS ; **2** : Une prise de sang pour isolement de PBMC des 6 animaux, est effectuée 35 jours plus tard.

3.1.4 Protocole clinique 2 - vaccination par voie parentérale avec un virus vivant atténué

Les protocoles 2a et 2b, ont été réalisés à la station expérimentale de Atton (54, France) du laboratoire de la rage et la faune sauvage de Nancy de l'ANSES. Ils ont été hébergés dans des modules animaleries de niveau de sécurité A3 et manipulés par du personnel vacciné, habilité et compétent sous la supervision du Dr Jacques Barrat.

Les animaux

Les animaux des protocoles 2a et 2b, proviennent de différents protocoles expérimentaux qui ont fait l'objet de demandes d'autorisation auprès du comité d'éthique. Les procédures de prélèvements sanguins effectuées dans le cadre de mon projet ont été ajoutées aux dossiers correspondants.

Le protocole 2a concerne 4 chiens beagles mâles de 3 mois, acclimatés au laboratoire le jour des prélèvements sanguins.

Les animaux du protocole 2b sont 3 beagles mâles (A, B et C) de un an et demi, qui ont été inoculés à l'âge de un an avec des souches de virus RABV de l'Institut Pasteur de Paris (IPP).

En ce qui concerne le chien A, il a reçu 102.4 DL50 ICS de la souche 0842FRA de l'IPP (souche canine originaire du Maroc), sous forme d'un broyat de cerveau par voie intramusculaire.

Les chiens B et C ont été inoculés à l'âge de un an également, avec la souche vulpine RR1a, par voie intramusculaire et périnerveuse (mime de morsure). Ils ont reçu respectivement 103.3 DL50 IC souris et 106.0 DL50 IC souris.

Au bout de six mois, aucun des trois animaux inoculés n'est mort.

Protocole de vaccination

Le vaccin SAG2[®] VIRBAC (Carros, 06 France) est un virus vivant atténué moléculairement par 2 mutations (Lafay et al., 1994).

Les trois animaux du protocole 2b (uniquement), ont reçu par voie intramusculaire (muscle fémoral), 2 mL d'un vaccin SAG2[®] du lot 4M75, titré à $10^{8.7}$ TCID₅₀/mL (voir définition d'un titrage).

Prélèvements sanguins pour analyses

En ce qui concerne le protocole 2a, un prélèvement sanguin (protocole correspondant section 3.1.6 page 37) à été effectué sur chaque chien pour isolement de PBMC. Un prélèvement a également été réalisé pour confirmer l'absence de RVNA par FAVN test (voir section 3.3.1 page 48).

Un prélèvement sanguin à J0 (juste avant la vaccination) ainsi qu'à J35 (juste avant l'euthanasie), des animaux du protocole 2b a été réalisé dans le but de titrer les RVNA et confirmer le statut vaccinal des animaux. En parallèle, un prélèvement sanguin a été fait et les PBMC isolées et congelées.

Durant ladite phase vaccinale (avec le vaccin SAG2), des prises de sang ont été faites à J3, J6, J9, J13 et J20 après la vaccination (voir le schéma résumant le protocole 2b figure 3.2).

Euthanasie

Ces animaux ont été euthanasiés et un diagnostic a été réalisé afin de confirmer l'absence de virus dans le SNC (protocoles correspondants section 3.3.2 page 49).

3.1.5 Protocole clinique 3 - vaccination par voie orale avec un virus vivant atténué

Toutes les manipulations des animaux ont été effectuées par nos collègues de l'ONSSA dans leurs locaux prévus à cet effet sous la supervision du Dr Sami Darkaoui.

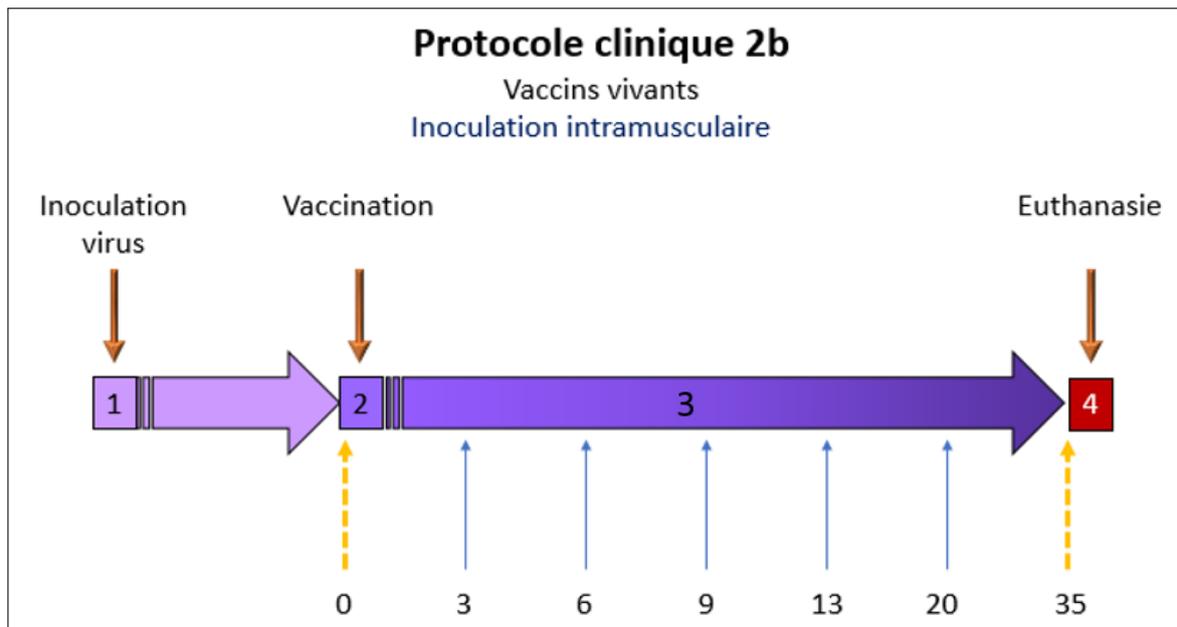


FIGURE 3.2 – Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 2 b. **1** : Les trois animaux vaccinés sont inoculés avec des virus RABV ; **2** : Après une prise de sang pour titrage sérologique et isolement de PBMC, une vaccination par injection intramusculaire de SAG2 est réalisée sur ces mêmes animaux ; **3** : Des prélèvements sanguins pour isolement de PBMC sont effectués à intervalle régulier durant environ 37 jours ; **4** : Après une prise de sang pour titrage sérologique et isolement de PBMC, les animaux sont euthanasiés et un diagnostic réalisé pour montrer l'absence de virus dans le SNC.

Les animaux

Des chiens tout venant, sans race ont été capturés dans les environs de Rabat (Maroc) à environ 2 mois, juste sevrés et considérés comme n'ayant pas été en contact direct avec le virus.

Une période de quarantaine de 6 mois a été suivie pour que d'une part les anticorps de la mère le cas échéant puissent être éliminés et qu'une éventuelle contamination rabique puisse se révéler.

Les animaux ont été vaccinés contre le parvovirus et vermifugés à leur arrivée au centre. Ils ont été placés ensemble dans une grande pièce durant toute la quarantaine et la phase vaccinale. Après l'épreuve virulente, ils ont été isolés dans des cages individuelles.

Protocole de vaccination

Le vaccin SAG2 utilisé titré à 10^7 TCID₅₀/mL, est le vaccin.

2 mL ont été instillés oralement (à l'aide d'une sonde de gavage pour rat) aux animaux du groupe A (6 animaux).

2 mL ont été injectés dans le muscle biceps fémoral, aux chiens du groupe B (2 animaux).

2 mL de PBS ont été injectés dans le muscle biceps fémoral, aux chiens du groupe C (4 animaux).

Un suivi de la température et du poids des animaux est effectué durant environ 6 mois jusqu'au jours de l'épreuve virulente.

Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins en vue d'isoler les PBMC et le sérum sont effectués une fois par semaine pendant 7 semaines puis une fois par mois pendant 2 mois et enfin une fois juste avant l'épreuve virulente. Deux derniers prélèvements ont été effectués 7 jours et 2 mois après l'épreuve virulente (figure 3.3) .

		Code Animal	Phase vaccinale												
Groupe A	Voie Orale	C513	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C511	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C501	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C502	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C515	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C508	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
Groupe B	Voie IM	C509	*	*	*		*		*		*	*	*	*	*
		C504	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
Groupe C	Pas de vaccin	C506	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C512	*	*		*		*		*	*	*	*	*	*
		C510	*		*		*		*		*	*	*	*	*
		C514	*		*		*		*		*	*	*	*	*
			J-1	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J60	J90	J168	T7	T83
			Vaccination						Challenge						

FIGURE 3.3 – Schéma d'échantillonnage du protocole clinique d'efficacité vaccinale. Une astérisque (*) représente une prise de sang pour sérologie et une prise de sang pour isolement de PBMC.

Les prélèvements sanguins ont été effectués selon la méthode décrite section 3.1.6 page 37.

Epreuve virulente

L'épreuve virulente (ou challenge) ne concerne que le protocole 3. Il s'agit d'une inoculation de virus à une dose mortelle dans le but de démontrer la protection effective

d'un vaccin, les animaux non vaccinés développant la maladie, meurent. Cette épreuve est validée si 80 % des animaux naïfs meurent de rage.

Le virus utilisé pour l'épreuve virulente est le virus ariana 2 (ou lot NN44), premier passage sur chien d'une souche sauvage isolée de glandes salivaires d'un chien en Tunisie (Perrin et al., 1999). Il est issu d'un broyat de glandes salivaires diluées au cinquième dans du milieu de culture. Le surnageant a été aliquoté en ampoules de verre et stocké à l'azote. Il a souvent été utilisé dans ce type d'expérience. Ainsi sa létalité a été montrée sur chien et un suivi réalisé, les délais de mortalités étant observés selon la dose réellement inoculée (voir en annexe, figure 10).

Le titre du stock de la souche Ariana 2 est de $10^{5,3}$ DL50ICS/0.03 mL de glande salivaire (GS).

La dose inoculée à des renards est habituellement de 1000 DL50ICS/mL alors que l'on vise habituellement 200 pour le chien.

On vise ici 500 DL50ICS/mL c'est-à-dire $10^{2,7}$ DL50ICS/mL Ce qui correspond à une dilution du virus de -4,1 LOG (détail des dilutions du virus d'épreuve virulente figure 3.4).

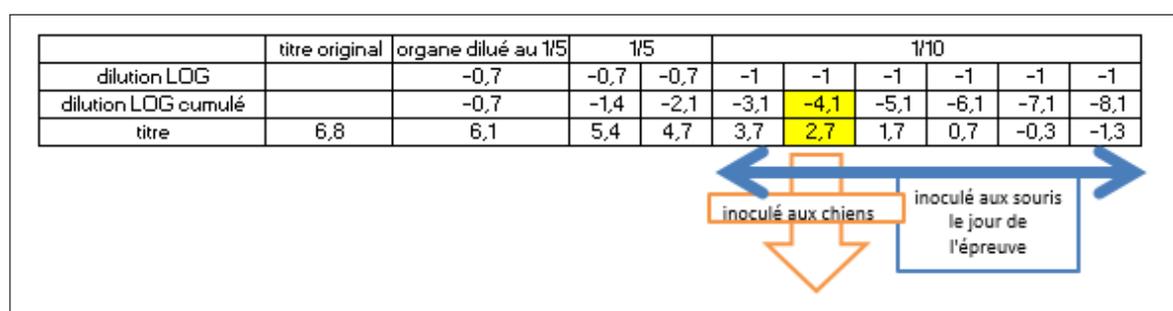


FIGURE 3.4 – **Série de dilutions du virus d'épreuve virulente.** Les six dernières dilutions entourant le titre visé ($10^{2,7}$ DL50ICS/mL) sont inoculées à des souris pour titrage. On inocule au chien le titre visé.

1 mL de la dilution cible est injectée dans le muscle temporal. Immédiatement après, un titrage sur souris par inoculation intracérébrale est effectué avec les 6 dernières dilutions entourant le titre visé. Ce titrage est effectué ici, par nos collègues Marocains de l'ONSSA.

Euthanasie

Ces animaux ont été euthanasiés et un diagnostic a été réalisé afin de confirmer l'absence de virus dans le SNC (protocoles correspondants section 3.3.2 page 49).

Le schéma figure 3.5 résume les grandes étapes du protocole clinique 3 concernant les animaux vaccinés.

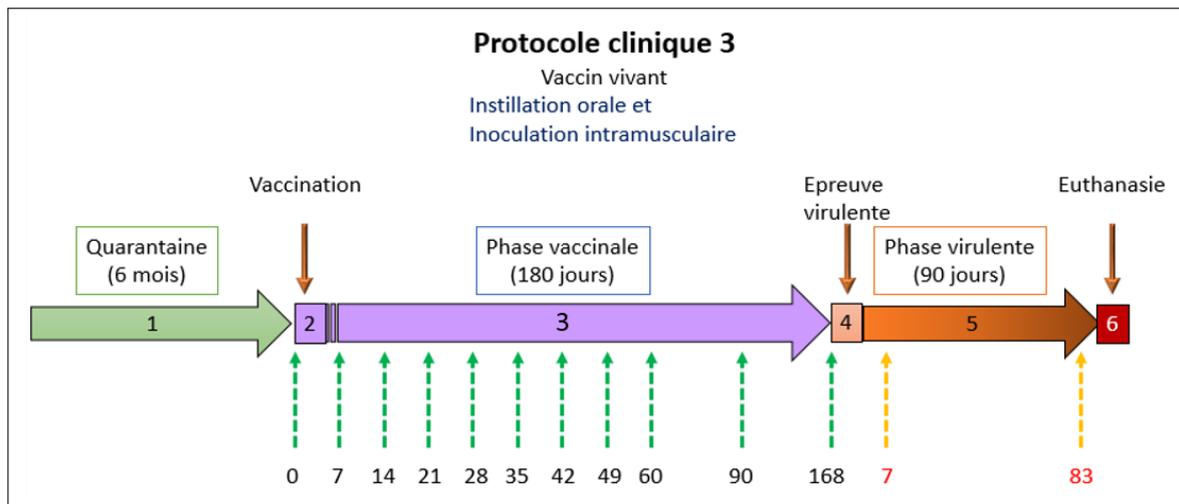


FIGURE 3.5 – Schéma résumant les grandes étapes du protocole clinique 3. **1** : Les animaux, capturés sur le terrain à l'âge de 2 mois, sont maintenus en quarantaine durant 6 mois afin d'éliminer les RVNA maternels potentiels ou une possible contamination ; **2** : Après deux prélèvements sanguins pour titrage sérologique et isolement de PBMC, les animaux du groupe A reçoivent par instillation 2 mL de SAG2, les animaux du groupe B, une injection intramusculaire de 2 mL du même vaccin et les animaux naïfs du groupe C reçoivent une injection de 2 mL de PBS ; **3** : Durant la phase vaccinale, des prélèvements sanguins pour titrage sérologique et isolement de PBMC sont réalisés toutes les semaines jusqu'à 60 jours, puis deux autres un mois et deux mois post-vaccination ; **4** : Une épreuve virulente est réalisée en injectant à tous les chiens une dose d'un virus rabique d'une souche connue létale pour des animaux non vaccinés ; **5** : Durant la phase virulente, les animaux sont isolés et l'on surveille leur comportements et l'apparition des symptômes rabiques. Les animaux morts sont diagnostiqués pour la présence de virus dans le SNC ; **6** : Les animaux survivants sont euthanasiés et un diagnostic réalisé pour montrer l'absence de virus dans le SNC.

3.1.6 Méthode de prélèvements sanguins

En ce qui concerne le protocole 1, les seules informations en ma possession sont que les prélèvements sanguins ont été réalisés par des techniciens animaliers de chez Boehringer Ingelheim (Lyon, France) avec des tubes de prélèvement héparine calcium.

Ce protocole est régulièrement mis en application dans ce laboratoire et sa procédure est confortée par une mise sous qualité. En effet tous les lots de vaccins commerciaux comme RABISIN, doivent être libérés en testant leur immunogénicité. La méthode est donc une référence par rapport à ma méthode mise au point et non éprouvée.

J'ai participé aux échantillonnages des protocoles 2a et 2b. En ce qui concerne le protocole 3, un vétérinaire de l'ONSSA les a effectués.

Les prélèvements sanguins des protocoles 2a et b et 3, ont été effectués avec le protocole suivant.

Les prélèvements sanguins sont réalisés au niveau de la veine jugulaire ou bien la

veine saphène sur la patte avant, après un léger garrot. Le biseau de l'aiguille devant se placer parallèlement à la peau du chien préalablement rasée, il est important d'éviter de dégrader les tissus par risque de coagulation et réaction locale inflammatoire pouvant éventuellement apporter un «biais immunologique».

A l'aide de tubes S-Monovettes® (Sarstedt, France) « serum-gel » contenant un activateur de coagulation, nous avons prélevé 3 mL de sang pour le dosage des anticorps. Les tubes ont été centrifugés à 2000 g durant 15 minutes pour séparer le serum du sang total. Le serum a été conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse (voir section 3.3.1 page 48).

10 mL de sang pour l'isolement des PBMC (voir section 3.2.1 page 38) ont été prélevés à l'aide de tubes S-Monovettes® (Sarstedt, France) « Heparine-Lithium » contenant un anticoagulant. Moins nocif pour les cellules à moyen terme que l'EDTA, nous avons sélectionné celui-ci en prévision de manipulations sur le terrain, le temps avant traitement pouvant risquer d'être long.

3.2 Approche *in vitro*

3.2.1 Les cellules

La manipulation des PBMC est délicate car il s'agit de cellules primaires. Une variabilité de résultats pouvant provenir des différentes étapes décrites ci-après, une mise au point est nécessaire pour obtenir les meilleurs rendements, la meilleure qualité et une homogénéité dans les lots de cellules obtenues (Riedhammer et al., 2014).

L'isolement

Le sang total est constitué d'hématies, de plaquettes, et de cellules à noyau dont les polynucléaires et les PBMC qui regroupent les lymphocytes (T, B et NK) et les monocytes (macrophages et quelques CD).

Isolement des PBMC du protocole 1 Les isollements des PBMC du protocole clinique 1, ont été réalisés par l'équipe R&D immunologie de Boehringer Ingelheim selon le protocole établi suivant.

Dans un flacon de 15 mL contenant 6 mL de milieu de séparation des lymphocytes PANCOLL® Humain (PAN biotech™) d'une densité de 1.077 g/mL et une osmolarité de 280 à 300 mOSM/kg, on ajoute délicatement (sans mélanger), 8 mL de sang total.

Une centrifugation 30 minutes à 1200 g à température ambiante et sans le frein, permet de collecter l'anneau de PBMC formé à l'interface PANCOLL/plasma. Les cellules sont

lavées 3 fois avec 15 mL de PBS stérile avec une centrifugation à 400 g durant 10 minutes à température ambiante.

Les PBMC sont re-suspendues dans un faible volume de milieu de culture (RPMI 1640 (Invitrogen, Life technologies), 10 % Sérum de Veau Foetal (SVF) irradié, 1 % Penicilline-streptomycine 5000 U/mL (Invitrogen, Life technologies), 0,01 % 2 β -Mercaptoethanol) 14.3M solution (Sigma Aldrich) pour numération.

La qualité des cellules est mesurée et interprétée après une analyse par cytométrie en flux (section 3.2.1 page 42).

Ce protocole est régulièrement mis en application dans ce laboratoire et sa procédure est confortée par une mise sous qualité. Les cellules, issues de l'isolement par cette méthode sont donc considérées comme des cellules de référence, après validation par une méthode de référence (ELISPOT 3.3.5).

Isolement des PBMC des protocoles 2a, 2b et 3 En ce qui concerne les protocoles 2a et b, j'ai réalisé toutes les manipulations au laboratoire de virologie de la station expérimentale de Atton (voir section 3.2 page 34).

Les isolements de PBMC dans le cadre du protocole 3 ont été effectués par une technicienne de l'ONSSA (voir section 3.5) que j'ai formé à distance à la technique, à l'aide de protocoles techniques détaillés et de nombreuses communications orales et emails.

Les PBMC de tous les protocoles cliniques ont été effectués avec le même protocole d'isolement, en déposant 10 mL de sang total de chien (voir section 3.1) dilué au demi, avec du PBS contenant 2 % de SVF décomplémenté, sur un coussin de 15 mL de lymphoprep® (Stemcell technologies™) ayant une densité de 1,007 g/mL. A cette pression osmotique, les granulocytes et les érythrocytes ont une densité supérieure et sédimentent à travers le tampon durant une centrifugation de 10 minutes à 1200 g. Les polysaccharides le constituant, permettent l'agrégation des érythrocytes en augmentant leur sédimentation. Les monocytes ayant une densité inférieure, restent à l'interface entre le plasma et le tampon.

Un tube spécifique est utilisé pour faciliter et accélérer le processus. En effet le tube Sepmate® (Stemcell technologies™) contient un anneau de plastique qui se situe au niveau de la surface du tampon. Après centrifugation (sans frein), l'interface plasma/tampon se situe juste au dessus et le culot est pris au piège au dessous. La phase supérieure peut alors être transférée par renversement dans un autre flacon. Dépourvues de lymphoprep, les PBMC peuvent être culotées ensuite avec du PBS 2 % SVF par une centrifugation à 400 g pendant 10 minutes à +4 °C et une reprise dans 5 mL de tampon de traitement. Un traitement (que l'on réalise systématiquement) est nécessaire pour éliminer les quelques traces d'hématies qui peuvent subsister.

On utilise alors le principe de choc osmotique pour que les cellules explosent dans le tampon dont la formule m'a été transmise (voir tableau 1 en annexe). Un contact de 10 minutes à +4 °C sous agitation suffit pour clarifier les monocytes.

8 mL de PBS 2 % SVF sont rajoutés ensuite avant un dernier lavage (centrifugation de 10 minutes à 400 g à +4 °C), nécessaire avant la numération. Le culot est repris avec 5 mL de PBS 2 % SVF. La suspension est stockée le temps de la numération, au maximum une heure à +4 °C).

Entre $3,5.10^6$ et $1,6.10^7$ cellules sont isolées par millilitre de sang en moyenne selon l'animal et le jour de la manipulation avec des viabilités systématiques de 100 % (voir section 3.2.1).

La congélation

N'ayant que ponctuellement accès à des échantillons de sang de chien, une congélation des PBMC a été indispensable pour les mises au point des techniques utilisées. De plus, l'optique ayant été de réaliser des échantillonnages sur le terrain et d'effectuer les expérimentations en laboratoire, il était impératif de mettre au point une méthode fiable de congélation des PBMC.

Il a été montré que la congélation des PBMC maintenait les fonctions CD4+ et CD8+ en ELISPOT assay chez l'Homme ([Kreher et al., 2003](#)) ainsi que la production de cytokines ([Wang et al., 1998](#)). Par contre des limites ont été décrites dans l'utilisation de PBMC cryopréservées pour des essais fonctionnels de caractérisation des cellules T ([Costantini et al., 2003](#); [Weinberg et al., 2009](#)). Ainsi, une optimisation est nécessaire pour maximiser la préservation des fonctions antigènes spécifiques des lymphocytes après congélation ([Disis et al., 2006](#)).

Il s'agit de ramener les cellules à une température très basse pour leur conservation en azote liquide (-162 °C). Un refroidissement lent des cellules entraîne la mort cellulaire par déshydratation. Un refroidissement rapide entraîne la mort cellulaire par dommages dus aux cristaux de glace interne. On ne peut pas protéger les cellules d'un refroidissement rapide. On peut au contraire utiliser un agent cryoprotecteur (ici le DiMethyl SulfOxide (DMSO)) qui protégera les cellules de la déshydratation. De plus un abaissement de la température à une vitesse lente permet au DMSO de remplacer l'eau sans porter atteinte à l'intégrité de la cellule. Une vitesse de -1 à -3 °C/minute est préconisée.

Après une centrifugation des cellules obtenues après isolement (section 3.2.1), les culots cellulaires sont repris avec un mélange de milieu RPMI sans Glutamine (GLN) avec 10 % de DMSO et 20 % de SVF.

Les cellules sont congelées à une densité de 7.510^6 cellules par cryotube NUNC® de contenance 1.5 mL.

Les tubes sont placés dans des boites spécialement conçues pour faire descendre la température des tubes contenus, de -1 °C/minute après stockage à -80 °C (vitesse de diminution idéale).

En ce qui concerne les protocoles 1 et 2 (section 3.1.3 et 3.1.4), on a utilisé les boites CoolCell® (biocision™) (annexe 5A). Il s'agit d'une boite en polystyrène compact, comportant un anneau de métal en son coeur qui permet la baisse de température de façon homogène et répétable.

En ce qui concerne le protocole 3 (section 3.1.5), les boites Mr. Frosty® (Nalgene™) ont été utilisées (annexe 5B). Le principe est un support pour les tubes en plastique. Ce support, dans la boite, se trouve en contact avec une mousse qui doit être en permanence imprégnée d'isopropanol. Il est crucial que la mousse ne s'assèche pas, en vérifiant régulièrement le niveau du produit. En effet c'est ce dernier qui permet une baisse de température idéale de -1 °C/minute.

En résumé, la congélation est une étape critique. Les cellules peuvent ne pas survivre à un contact trop long à température ambiante avec le milieu contenant du DMSO, ainsi qu'à une congélation trop rapide.

La décongélation

La décongélation est également une étape critique et doit être optimisée ([Ramachandran et al., 2012](#)).

En effet, elle doit être rapide, et plusieurs lavages sont nécessaires pour éliminer l'agent cryoprotecteur des cellules. Elle doit malgré tout être délicate car les cellules ont été physiquement fragilisées.

Plusieurs paramètres ont été testés et celui donnant une meilleure viabilité des cellules après décongélation, a été retenu.

Les cryotubes sont placés au bain marie à $+37$ °C jusqu'à ce que reste un petit glaçon. Une fois les tubes séchés et désinfectés, sous PSM, le contenu de plusieurs cryotubes est transféré, avec une pipette pasteur, délicatement (si nécessaire jusque 5, au delà, une perte de cellules a été constatée) dans un milieu complet (tableau 3.1 page 42) à température ambiante.

Un premier lavage avec une centrifugation à 400 g pendant 10 minutes permet d'éliminer le surnageant par renversement et le culot resolubilisé dans le faible volume restant. Il s'agit d'une étape importante, un culot mal resolubilisé à cette étape n'a que peu de chance de se solubiliser à nouveau. Un nouveau lavage est indispensable pour retirer tout

Tableau 3.1 – Composition du milieu complet

Milieu complet	
Réactifs	Concentration finale
RPMI	QSP
SVF	10 %
Glutamine	5 mM
Péniciline	100 mM
Streptomycine	100 U
Beta-mercapto-ethanol	10^{-5} M

le DMSO. Même remarque que précédemment pour la solubilisation du culot qui est plus coriace lors de ce deuxième lavage. Il faut y mettre le temps suffisant.

Analyse des cellules

Chacune des étapes de prélèvement sanguin (voir section 3.1.6), d'isolement des PBMC (voir section 3.2.1), de congélation (voir section 3.2.1) et de décongélation (voir section 3.2.1) est cruciale, et peut entraîner dans des conditions inadéquates, soit une perte de cellules, soit une mortalité ainsi que la perte de leur phénotype (capacité à sécréter correctement des cytokines etc.).

Il est indispensable de caractériser les différents lots de cellules en analysant ces trois paramètres. A chaque décongélation et avant toute utilisation d'une suspension cellulaire, la viabilité est mesurée et la concentration en cellule déterminée.

Numération automatique des cellules et mesure de la viabilité La numération se fait sur une dilution de la suspension au demi, avec du Bleu Trypan et est effectuée avec un compteur automatique, le TC20[®] (Biorad[™]). On obtient une concentration en cellules vivantes et le pourcentage de viabilité.

Analyse détaillée des cellules par cytométrie en flux On peut analyser lorsque cela est possible, également la composition des PBMC (types de cellules) et la viabilité associée à nos cellules cibles (les lymphocytes), par cytométrie en flux.

Nous n'avons pas de cytomètre en flux au laboratoire mais avons collaboré avec des collègues (équipe R&D immunologie, chez Boehringer Ingelheim[®]), ayant le matériel et l'expérience, j'ai été formée pour effectuer les manipulations nous ayant permis d'effectuer des analyses de viabilité sur toutes les cellules du protocole 1 (voir section 3.1.3) et quelques cellules du protocole 3 (voir section 3.1.5).

Le principe est le passage de cellules dans un canal très fin permettant d'isoler chaque

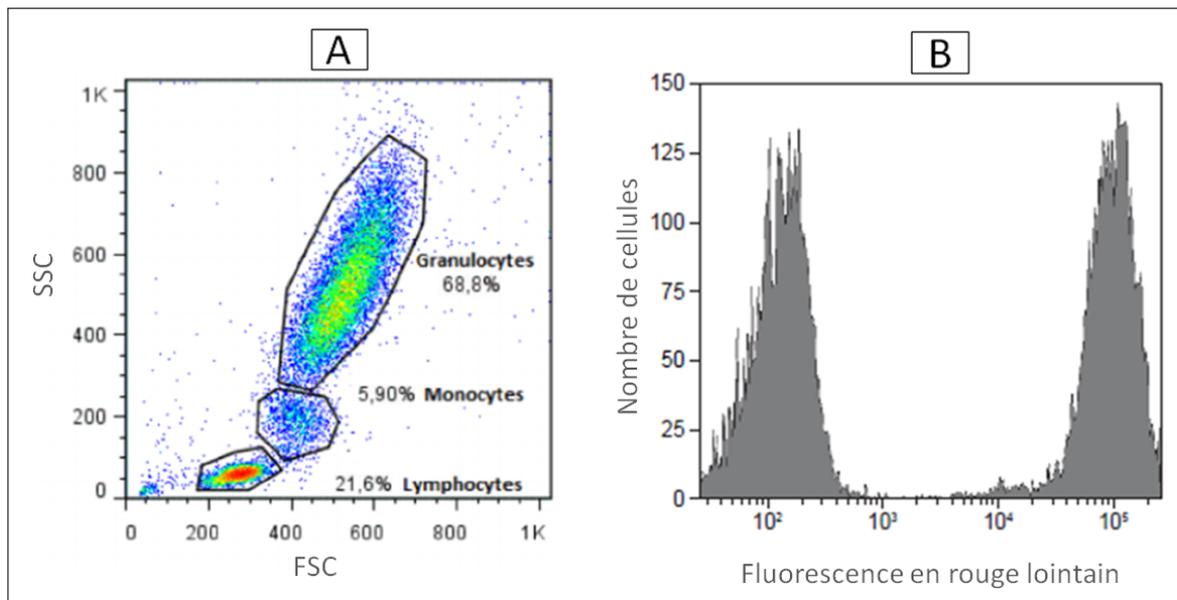


FIGURE 3.6 – **Caractérisation des cellules par cytométrie en flux A** : Différentes populations de cellules du sang total caractérisées en cytométrie en flux (BIO-RAD, 16). SSC-A représente la granularité et FSC-A la taille des cellules. **B** : Histogramme à un paramètre montrant le contraste entre le signal des cellules vivantes (pic de gauche) et cellules mortes (pic de droite) après un marquage au rouge lointain (far red) (image provenant du guide de l'utilisateur du kit LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).

cellule. Celles-ci passent devant des lasers et des capteurs situés à différents points et qui enregistrent un signal sur la base des caractéristiques de leur dispersion lumineuse.

On peut mesurer la taille des cellules, puis leur granularité. La représentation graphique a deux axes : SSC (Side light scatter) représentant la granularité ou la complexité, et en ordonnée FSC (Forward light scatter), pour la taille en abscisse. Les différentes populations de cellules du sang sont bien caractérisées avec cette technique car bien distinctes (voir figure 3.6A).

La viabilité cellulaire et la présence de composants cellulaires et de certaines protéines sont quelques-uns des paramètres qui peuvent être déterminés grâce au marquage des cellules avec des molécules ou anticorps fluorescents adaptés. La lumière fluorescente émise par ces colorants, quand ils traversent le laser d'excitation, est dirigée au travers du système optique puis analysée.

On utilise le kit VIVID LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit , for 633 or 635 nm excitation (Thermo Fisher Scientific Inc.) pour marquer les amines libres se situant à la surface des cellules et à l'intérieur de celles-ci. Le marqueur fluorescent pourra passer la membrane dégradée des cellules mortes, et aura accès aux amines libres internes, entraînant ainsi un marquage intense de ces cellules. La différence d'intensité entre les cellules mortes et vivantes est typiquement supérieure à 50 fois (voir figure

3.6B).

La lecture des signaux est réalisée avec le BD FACS CANTO™ II (BD) et l'analyse avec le logiciel du fabricant. Une première analyse est réalisée avec les critères SSC et FSC. On va alors repérer la population de lymphocytes (entre 50 K et 100 K) et les sélectionner pour ensuite visualiser les cellules avec les critères SSC et fluorescence en rouge lointain.

Le transport des PBMC congelées

En ce qui concerne les PBMC du protocole clinique 3 réalisé au Maroc, les cellules ont été envoyées par un transporteur sous carboglace. Avant cela elles ont été transférées, par barrettes de 5 cryotubes sortant d'un tank à azote, dans des sacs étanches. En tout environs 700 tubes ont été transférés du laboratoire Marocain au laboratoire de l'ANSES. A l'arrivée du colis, les barrettes ont été triées rapidement avant d'être transférées dans un tank à azote compatible avec le système de barrettes. Au bout de quelques années de stockage, il a fallu transférer les cellules dans un nouveau tank à azote, plus petit et au format boites.

Les cellules ont été triées rapidement et transférées dans des boites puis stockées à nouveau à l'azote.

3.2.2 Les stimulations

Principe et mise en œuvre Il s'agit, lorsqu'ils sont présents, de réactiver *in vitro* les lymphocytes mémoires spécifiques d'un antigène, avec ce même antigène. Les cellules activées auront alors diverses réactions que l'on pourra caractériser par différentes techniques.

Les suspensions cellulaires sont réparties dans des puits d'une plaque de culture 96 puits à fond rond à raison de 100 μL d'une suspension 2x concentrée dans du milieu complet (voir tableau 3.1).

Les principes actifs de stimulation, ou le milieu de culture (dans le cas de puits de cellules témoins non stimulées), sont répartis à raison de 100 μL d'une solution 2x concentrée.

L'incubation des plaques se fait dans une étuve humide à +36 °C à 5 % de CO₂ avec un temps variable selon l'essai.

A la fin de l'incubation, les plaques sont centrifugées à 1000 rcf pendant 5 minutes. On transfère alors la totalité du volume de surnageant avec 400 μL de milieu complet (dilution au tiers) que l'on stocke à -80 °C dans une plaque 96 puits à puits profonds «protein lowbind» (fabriquée avec un plastique traité pour ne pas capturer les protéines à sa surface), pour analyse des protéines du surnageant. Le culot est repris dans 200 μL

de Total RNA lysis buffer® du kit Iprep Purelink Total RNA® (INVITROGEN™) pour extraction d'ARN, après stockage dans des plaques 96 puits profonds DNA low bind (même remarque que plus haut mais les plaques sont traitées pour le stockage optimal d'acides nucléiques), à -80 °C.

3.2.3 Les antigènes

Les antigènes polyclonaux

Concanavalline A La Concanavalline A (ConA) est une lectine et se fixe principalement intracellulairement sur les groupes terminaux non réduits α -D-mannosyl et α -D-glucosyl. La ConA est connue pour stimuler quatre populations distinctes de LT et au moins un groupe de lymphocytes T humains (Palacios, 1982). Elle a été utilisée dans plusieurs travaux pour stimuler les lymphocytes canins (Chamizo et al., 2001; Saldarriaga et al., 2006; Im Hof et al., 2008; Rodrigues et al., 2009).

PMA/iono L'activation des lymphocytes T nécessite une cascade de réactions faisant intervenir plusieurs molécules et phénomènes clés. Elle passe par une activation d'une protéinase K C, et une augmentation de calcium intracellulaire.

Le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) est une petite molécule qui diffuse à travers la membrane plasmique et qui va directement activer une protéine kinase C shuntant la nécessité d'une fixation à un récepteur de surface. La ionomycine est un ionophore calcique sélectif très puissant qui augmente la concentration intracellulaire en calcium.

Ces deux molécules couplées ont été utilisées dans plusieurs travaux pour stimuler les lymphocytes canins (Lenarczyk et al., 2000; Hartley et al., 2014), en particulier Chapat et al. (2017) pour une stimulation *in vitro* avec un antigène rabique mettant en évidence par ELISPOT une immunité cellulaire spécifique.

Cette technique est utilisée comme recommandée dans cette dernière publication, à une concentration finale de 20 ng/mL de PMA et 1 μ M de ionomycine pour réaliser les stimulations dans le cadre de l'ELISPOT IFN γ .

L'antigène non spécifique

Pour contrôler la spécificité de la réponse au virus de la rage, on utilise un contrôle avec un antigène assez proche.

Le Calici Virus Félin, de l'anglais «Feline Calici Virus» (FCV) est, comme le virus de la rage, un virus à ARN enveloppé. Ce dernier est inactivé à la β -propiolactone et est utilisé à une concentration finale de 10 μ g/mL.

Je n'ai pas plus de précisions sur ce Principe actif (PA) car provenant d'une production privée, il ne m'en n'a pas été donné les détails de sa fabrication et ses caractéristiques précises.

L'antigène spécifique rabique (antigène de rappel)

Un virus rabique inactivé à la β -propiolactone est utilisé à une concentration finale de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ également.

Ce PA ayant la même provenance que l'antigène non spécifique et le même statut de propriété, je n'ai pas plus de précisions à détailler.

3.2.4 Les différents protocoles de stimulation mis en application

Mise en évidence d'une variation de l'expression des cytokines $\text{IFN}\gamma$ et IL4 par qPCR

Pour étudier l'effet dose par qPCR, d'un antigène polyclonal (la concanavaleineA) a différentes concentrations finales (0,63 ; 1,25 et 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), on réalise des stimulations sur les PBMC issues du protocole 2b, animal A et prélèvement sanguin de J3. Après décongélation, on réalise une stimulation de 2.10^6 cellules par puits, en duplicat et on incube 6 h à +37 °C en étuve humide avec 5 % de CO_2 .

Les plaques sont centrifugées et les culots repris dans du tampon de lyse selon le protocole décrit 3.2.2 page 44.

Avec les PBMC issues du protocole 2b, animal A et prélèvement sanguin de J3, on cherche à déterminer le temps d'incubation adéquat à cette réponse à conA, en stimulant 2.10^6 cellules par puits, en duplicat avec des concentrations finales de ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et une incubation de 6 h, 24 h et 48 h à +37 °C en étuve humide avec 5 % de CO_2 .

Les plaques sont centrifugées et les culots repris dans du tampon de lyse selon le protocole décrit 3.2.2 page 44.

Les ARN extraits sont traités en qPCR (section 3.4 page 53).

Validation des cellules de référence et l'antigène de rappel avec la méthode de référence ELISPOT $\text{IFN}\gamma$

Cette méthode de mesure de l'immunogénicité spécifique antirabique après vaccination avec Rabisin est décrite par [Chapat et al. \(2017\)](#) .

Les suspensions cellulaires fraîchement isolées du protocole 1 (section 3.2.1 page 38) ajustées à 10^7 cellules/mL avec du milieu de culture (voir composition tableau 3.1 en annexe) sont, pour chaque animal, réparties en 4 puits contenant 500 μL de milieu de culture à raison de 500 μL par puits (soit $5 \cdot 10^5$ cellules par puits). 100 μL de PBS (NA), 100 μL de PA FCV, 100 μL de PA rage et 100 μL de PMA/iono sont transférés aux concentrations décrites section 3.2.3 page 45. Une incubation de 48h est idéale et le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.3.5 page 52.

balayage des expressions en protéines et en transcrits, de plusieurs cytokines/chemiokines dont IFN γ

Dans le but de réaliser un balayage grossier (pas de réplicat) des expressions en protéines de plusieurs cytokines/chemiokines différentes dont IFN γ et IL4, on réalise un ELISA multiplexe grâce à la technologie luminex (voir section 3.3.4 page 51) sur les surnageants de stimulation et une qPCR sur les culots.

Ainsi les suspensions cellulaires précédemment décrites pour l'ELISPOT, sont en parallèle réparties en 4 puits d'une plaque 96 puits de culture cellulaire, à raison de 100 μL par puits (soit 10^6 cellules par puits). 100 μL de PBS (NA), 100 μL de PA FCV, 100 μL de PA rage et 100 μL de PMA/iono sont transférés aux concentrations décrites section 3.2.3 page 45. Une incubation de 72 h est idéale et le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.2.2 page 44.

Mesure de l'expression des ARNm, après activation avec l'antigène de rappel

Dans le but d'étudier le profil d'expression de IFN γ et IL-4 après une stimulation spécifique, des PBMC de chiens hyperimmunisés avec un vaccin antirabique (voir protocole 2b section 3.1.4 page 32) sont stimulées avec le PA rage sur 3 réplicats techniques de 10^6 cellules par puits.

5 cryotubes de PBMC du chien C du protocole 2b isolées d'un prélèvement sanguin à J9, sont décongelés (selon le protocole section 3.2.1 page 41) et les cellules analysées.

Le PA rage est transféré dans les puits aux concentrations décrites section 3.2.3 page 45. Une cinétique d'incubation à 3 h, 6 h et 48 h est réalisée dans une étuve humide à $+37^\circ\text{C}$ et 5 % de CO_2 .

En parallèle on stimule un puits de cellules avec de la ConA à une concentration de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 6h et 48h.

De plus on réalise deux puits de contrôle de cellules non stimulées dans lesquels on transfère 100 μL de PBS.

Le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.2.2 page 44 dans le but de récupérer les culots cellulaires et les surnageants de culture.

Détection de l'immunogénicité cellulaire antirabique par qPCR et ELISPOT

On désire mesurer une réponse cellulaire T, spécifique de $\text{IFN}\gamma$ après stimulation spécifique avec l'antigène de rappel (voir section 3.2.3 page 46) sur les PBMC des animaux des protocoles de vaccination avec un vaccin inactivé et un vaccin vivant, le tout comparé aux réponses obtenues par les animaux naïfs (voir protocoles 2a, 2b et 3 sections 3.1, 3.2 et 3.5 pages 32, 34 et 37). Les cellules des protocoles 1, 2a et 2b sont décongelées (section 3.2.1 page 41) et mises en culture à une concentration de 10^7 cellules/mL.

Pour ce qui est de l'ELISPOT, le protocole de stimulation est le même que celui utilisé pour la validation des cellules de référence (section 3.2.4 page 46). Des stimulations sont réalisées (section 3.2.2 page 44) en quatre réplicats pour les traitements avec le PA rage, le PA FCV, PMA/iono et le contrôle non stimulé NA.

En ce qui concerne la stimulation en plaque de culture 96 puits dans l'optique d'une analyse en ELISA et en qPCR, les cellules sont distribuées à raison de 10^6 cellules/puits et les stimulations comme décrites section 3.2.4 page 47 et le traitement des plaques se fait selon le protocole décrit section 3.2.2 page 44 dans le but de récupérer les culots cellulaires et les surnageants de culture.

Mesure de la réponse cellulaire à un vaccin vivant inoculé par voie orale

Suivant les résultats obtenus lors des stimulations décrites, les PBMCs du protocole clinique 3 seront toutes décongelées et on réalisera soit une stimulation en plaque ELISPOT, soit en plaque de culture pour un ELISA et une qPCR, soit les deux selon la quantité et la qualité des cellules après décongélation.

3.3 Approche analytique avec cibles protéiques

3.3.1 Le titrage des anticorps neutralisants

Les anticorps neutralisants présents dans le sérum des chiens vaccinés sont titrés selon la méthode FAVN test (Cliquet et al., 1998).

Les titrages ont été réalisés par l'équipe « sérologie » du laboratoire qui est formé à cette méthode dont le laboratoire est accrédité.

Brièvement, les sérums sous différentes dilutions sont placés en présence de virus fixe de référence ayant une concentration connue, dans des puits d'une plaque 96 puits. Après

incubation d'une heure à +37 °C, les cellules BHK21 sont ajoutées.

Après 48h d'incubation à +37 °C et 5 % de CO₂, un immunomarquage à l'aide d'un anticorps antirabique marqué à la fluoresceïne isothiocyanate (FITC) est réalisé. Le nombre de puits par dilution, présentant de l'immunofluorescence est compté. Selon la méthode de Spearman-Kärber et grâce à l'utilisation d'un sérum de référence de titre connu, on calcule un titre d'anticorps correspondant à la quantité d'anticorps ayant neutralisé la moitié des virus, et qui s'exprime en "UI/mL".

3.3.2 Diagnostic de rage par immunomarquage direct (FAT) et de particules infectieuses en culture cellulaire (RTCIT)

Le diagnostic de rage se réalise post-mortem en prélevant le SNC de l'animal décédé.

Le but est d'une part pour les animaux morts en cours de protocole clinique après une épreuve virulente (animaux naïfs du protocole 3), de savoir s'il s'agit d'une infection à virus rabique. D'autre part, en fin des protocoles cliniques 2b et 3 (pour les animaux vaccinés), il s'agit de confirmer l'absence d'infection.

Pour le protocole 2b, le diagnostic est réalisé au laboratoire de l'ANSES, par une équipe compétente et dédiée. En ce qui concerne le protocole 3, le même protocole est réalisé au laboratoire de l'ONSSA.

On cherche en parallèle à mettre en évidence la présence de protéines virales dans le SNC quel que soit l'état du virus (FAT) et la présence de virus infectieux (RTCIT). Ces techniques sont des techniques de référence de l'OIE pour le diagnostic rabique.

Brièvement, en ce qui concerne le FAT, une coupe de SNC est déposée sur une lame de microscopie pour en réaliser une empreinte. Après fixation à l'acétone, un conjugué anticorps anti-rabique et un FITC, sont déposés dessus. Après un lavage à l'eau, une lecture se fait sous un microscope à lampe de mercure. En cas de présence de virus, on peut voir des *foci* verts.

Le diagnostic en RTCIT se réalise à partir de cellules nerveuses saines (lignée N2a ATCC). Les virus sont inoculées aux cellules et après 48 h d'incubation à +37 °C en étuve humide avec 5 % de CO₂, le tapi cellulaire est fixé à l'acétone et le conjugué immunomarqué est déposé et incubé à +37 °C en étuve humide avec 5 % de CO₂. Après un lavage à l'eau, une lecture se fait sous un microscope à lampe de mercure. En cas de présence de virus, on peut voir des *foci* verts.

3.3.3 La quantification des protéines par ELISA

On désire mesurer une réponse spécifique en protéines IFN γ sécrétées dans le surnageant de culture, après stimulation spécifique avec l'antigène de rappel (section 3.2.3 page 46) sur les PBMC des animaux des protocoles 2 et 3. Des stimulations sont réalisées (section 3.2.2 page 44) en quatre réplicats pour les traitements avec le PA rage, le PA FCV, PMA/iono et la contrôle non stimulé NA.

Dans le but de mesurer une réponse en protéines IFN γ dans le surnageant de culture cellulaire, on effectue un Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

On utilise les kits «Canine IFN-gamma DuoSet ELISA»[®] et «Canine IL-4 DuoSet ELISA»[®] de R&D systems[™], selon les modes opératoires du fabricant. Les réactifs nécessaires se retrouvent sous une autre référence également chez le même fabricant : le Ancillary duoset reagents 2.

En ce qui concerne le kit ELISA IFN γ , un standard est fourni et une courbe est effectuée avec les résultats de chacune des 6 dilutions au demi effectuées dans de la Bovine Serum Albumine (BSA), donnant une gamme allant de 2000 pg/mL à 31,3 pg/mL.

La gamme du standard de IL-4 va de 6000 pg/mL à 93,8 pg/mL.

Principe et mode opératoire

Le principe est un ELISA sandwich avec mesure par colorimétrie.

Il s'agit de plaques sur le fond des puits desquels on fait s'accrocher sur la nuit à température ambiante, des anticorps de captures dirigés contre les cytokines cibles. Chaque étape est suivie d'une série de trois lavages avec un tampon contenant 0,05% de tween dans du PBS.

Le fond de la plaque est «bloqué» avec de la BSA, c'est à dire que celle-ci s'accroche également au fond du puits, là où il n'y a pas d'anticorps, pour ne pas laisser de surface plastique pouvant accrocher nos protéines d'intérêt (baisse du bruit de fond).

100 μ L d'échantillon ou de standard sont transférés alors dans les puits et la plaque est incubée 2h à température ambiante.

Des anticorps de détection biotinylés sur leur partie Fc (figure 4 en annexe), sont introduits à une concentration optimisée par le fabricant. Ils reconnaissent la cible également.

L'étape suivante est la fixation par forte affinité à la biotine, de la streptavidine qui est couplée à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxydase).

Le substrat de l'enzyme HRP est ensuite introduit. Il s'agit du TMB (Tetramethylbenzidine), dont le produit de dégradation est bleu. Sa concentration est proportionnelle à la quantité d'anticorps de détection fixés, qui est proportionnelle à la quantité de protéines cibles introduites.

De l'acide chlorhydrique stoppe la réaction et transforme le bleu en jaune et stabilise la réaction durant quelques heures.

Lors de la lecture au spectrophotomètre un spectre lumineux continu provenant d'une lampe halogène traverse les puits et des lectures de longueur d'ondes (Densité Optique (DO)) sont effectuées avec un filtre principal à 450 nm et un filtre à 540 nm pour une correction et éliminer le bruit de fond individuel de chaque puits.

Traitement des données brutes

Plusieurs étapes de traitements des données brutes sont effectuées.

En premier lieu une soustraction des valeurs de DO du filtre 540 nm aux valeurs du filtre 450 nm est effectuée pour retirer le bruit de fond, comme le préconise le fabricant.

Ensuite concernant le standard, la valeur du « blanc » (bruit de fond) est soustraite aux différentes valeurs des dilutions.

Les données ainsi transformées sont introduites dans l'application en ligne du site www.elisaanalysis.com afin d'obtenir une courbe de régression logistique à 4 paramètres (voir exemple annexe 9) avec le standard. Cette dernière permet d'obtenir les correspondances de chaque DO mesurée par échantillon (en réplicats), en concentration moyenne.

Validation de l'essai

Pour valider un essai ELISA, on analyse le standard. Le R^2 de la courbe doit être très proche de $1 \pm 0,01$ et la DO du « blanc » doit être plus petite que celle de toutes les dilutions.

3.3.4 La quantification des protéines par Luminex

La technologie xMAP[®] Technology (unknown multi analyte profiling) permet de réaliser sur un même surnageant, un dosage type ELISA de de multiples protéines. Il s'agit de capturer les protéines par des anticorps de captures accrochés à un support. Ici on utilise des microbilles magnétiques. Les étapes suivantes consistent en un accrochage secondaire avec un anticorps de détection marqué dont on pourra lire la fluorescence avec un lecteur compatible. L'intérêt de cette technologie est qu'il est possible de fixer sur les billes des anticorps, jusqu'à 80 cibles différentes, pour réaliser en un seul puits une analyse multiplexe.

Après une stimulation (voir section 3.2.4 page 47), les concentrations de multiples cytokines canines (IL-8 (CXCL8), SCF, IL-2, IL-10, tumour necrosis factor [TNF]- α , IL-4, IL-12/IL-23 p40, VEGF-A, IL-6, MCP-1 (CCL2) et IFN γ) sécrétées dans le surnageant

de culture ont été dosées en utilisant le kit LUMINEX (Affymetrix ProcartaPlex Canine 11-Plex, Ebioscience SAS, Paris, France), selon les recommandations du fabricant, la lecture se faisant avec l'appareil Luminex® FLEXMAP 3D® System et l'analyse avec le logiciel l'accompagnant.

Un standard est dilué en série pour chaque cible et une courbe de régression logistique à 4 paramètres est réalisée par le logiciel intégré à la machine. On pourra alors calculer les concentrations pour chaque cible dans chaque puits.

3.3.5 La détection de cellules immunitaires répondantes par ELISPOT IFN γ

L'ELISPOT IFN γ est utilisé par Chapat et al. pour montrer une immunogénicité de leur vaccin (RABISIN) chez des chiens beagles (Chapat et al., 2017). C'est donc une méthode référente face à laquelle on compte comparer les résultats de notre méthode de qPCR.

Principe et mode opératoire

Les ELISPOT sont réalisés avec le kit Canine IFN-gamma ELISPOT R&D systems™ selon le mode opératoire décrit par Chapat et al. (2017) dans le laboratoire de laquelle j'ai été formée à cette technique). La lecture des spots se fait avec l'intermédiaire d'un lecteur automatique suivi d'une réinterprétation par un opérateur qualifié.

Le kit contient une plaque 96 puits «précoatée» avec des anticorps de captures reconnaissant l'IFN γ canin. Le fond de ces puits est fait d'une membrane fine, permettant la culture de cellules sur une «couche» d'anticorps.

Après une étape d'hydratation de la membrane avec du milieu de culture pendant 2 h à température ambiante, nous réalisons alors une stimulation comme décrite plus haut (section 3.2.4 concernant les cellules du protocole clinique 1 fraîchement isolées et section 3.2.4) concernant les cellules du même protocole clinique 3 congelée et décongelées ainsi que les cellules des protocoles 2a et 2b.

Les clones de lymphocytes T répondant à la stimulation vont sécréter des cytokines qui seront immédiatement capturées par les anticorps sur lesquels les cellules reposent.

Après l'incubation de 48 heures, les surnageants sont retirés par retournement et 200 μ L d'eau froide déionisée sont ajoutées et incubées à température ambiante durant 5 minutes puis «flushées» (par aspiration refoulement rapide à l'aide d'une micropipette multicanale manuelle). Cette étape est recommandée pour éliminer le bruit de fond.

La plaque est lavée 3 fois à l'aide du tampon concentré du kit préalablement dilué 10

fois avec de l'eau déionisée.

100 μL d'anticorps de détection biotinylés sont introduits pour se fixer sur les protéines d'intérêt et incubés une nuit à +4 °C.

100 μL d'un conjugué alcaline phosphatase (AP) - streptavidine est ensuite ajouté après 3 lavages au tampon 1x suivi d'une incubation à température ambiante pendant 2 heures, la streptavidine se fixant fortement à la biotine.

L'ajout de 100 μL du chromogène BCIP/NBT (nitro-blue tetrazolium et 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate), va réagir durant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité avec l'alkaline phosphatase pour produire un produit coloré visible au niveau de chaque clone ayant réagi positivement. Apparaîtront alors des points de couleur indigo que l'on nomme des "spots". Le comptage est effectué à l'aide d'une caméra CCD pilotée par un logiciel *SPOT Software* (Microvision Instruments, Lisses, France), et corrigé à l'œil par un opérateur expérimenté.

En ce qui concerne les stimulations des cellules fraîches du protocole clinique 1 et l'analyse des spots, ils ont été réalisés au laboratoire de R&D immunologie de Boehringer Ingelheim avec un opérateur expérimenté. Pour la stimulation et les stimulations concernant les protocoles 1 (cellules congelées) et 2, j'ai réalisé les manipulations au laboratoire de l'ANSES et effectué la lecture sur un appareil du CHU de Brabois mis à disposition. Je n'ai pas réalisé de correction post-analyse automatique car je ne suis pas expérimentée dans le domaine. Un bruit de fond sera possiblement supérieur pour cette expérience.

Traitement des données brutes

Les spots sont comptés par puits.

Pour chaque traitement, on réalise un test statistique (voir section 3.5 page 68) sur les données brutes dans le but de déterminer s'il y a ou non une réponse T significative entre les cellules stimulées et les cellules non stimulées.

On calcule ensuite la différence entre le nombre de spots pour un traitement (pour chaque puits) et la moyenne du nombre de spots correspondant aux cellules non stimulées (NA) que l'on représente graphiquement ainsi que les médianes et les quartiles.

3.4 Approche analytique avec ciblage des transcrits

3.4.1 Les principes généraux

Lorsqu'une cellule reçoit un signal, une cascade de réactions est déclenchée. Selon le signal, un facteur d'expression va déclencher l'expression de certains gènes spécifiques en

se positionnant sur la région promotrice du gène. Celui-ci est composé d'introns (régions non codantes) et d'exons (régions codantes). Seuls ces derniers seront transcrits c'est-à-dire qu'un brin d'ARN complémentaire stabilisé (le «transcrit»), va être synthétisé par une ARN polymérase (ADN dépendante) (voir en annexe schéma 7). Ces derniers seront traduits en protéines. Dans notre projet, des cytokines sont produites à partir des transcrits, et sécrétées dans le surnageant.

Le principe de l'analyse des transcrits est de mesurer l'effet d'un traitement, sur l'expression d'un gène cible. On comparera alors la quantité d'ARN messager (ARNm) dans des cellules traitées par rapport à des cellules non traitées (le calibrateur). De plus l'expression de ces gènes d'intérêt sera calibrée par rapport à un gène qui ne sera pas impacté par le traitement (le gène de référence) (voir section 3.4.2 page 56).

Une fois l'ARN extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire, ce dernier pourra être amplifié par PCR.

La PCR ou Polymérase Chain Reaction conduit à l'amplification *in vitro* de plusieurs milliers de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voire très rare (10-2pg) (Higuchi et al., 1992; Wittwer et al., 1997; Kubista et al., Jun). Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, à la capacité de l'enzyme ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces (ou primer) s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrans dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins.

La PCR s'effectue en 3 étapes (voir figure 3.7 page 55) :

- Dénaturation thermique de l'ADN : à +95 °C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- Hybridation des amorces : le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrans d'ADN est comprise entre +50 °C et +65 °C (0 d'hybridation (T_m)). Les amorces en large excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- Extension des amorces : intervention de la Taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée en s'accrochant à l'extrémité 3' d'une amorce. Cette étape s'effectue à une température de +72 °C.

- Au deuxième cycle : la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les 2 amorces font leur apparition.
- Au troisième cycle : Les premiers amplicons apparaissent (ADN double brins borné par les amorces correspondant au fragment d'ADN recherché).

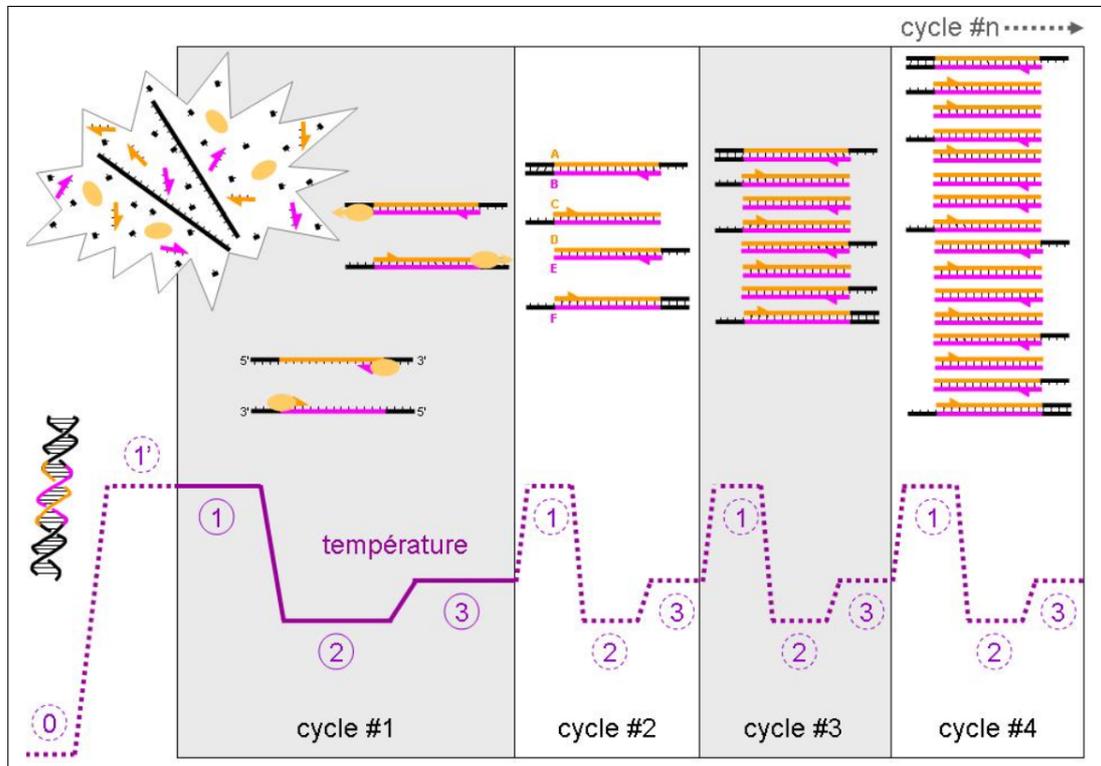


FIGURE 3.7 – Principe de la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR).
wikipedia (licence GFDL + CC-by-sa)

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé un thermocycleur dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (conditions de la PCR). La réaction PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

Lorsque la quantité de produits d'amplification est suffisante, ceux-ci sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose. Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel additionné d'un produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques faisant apparaître à la molécule d'ADN une fluorescence sous illumination par des UV courts (environ 300 nm ou une lumière bleue). La vitesse de migration étant dépendante de la masse de la molécule, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons peuvent être facilement vérifiables sur le gel.

La technologie des sondes à hydrolyse (autrement appelées TaqMan™) permet d'observer informatiquement l'amplification en temps réel. En effet elle fait intervenir un troisième oligonucléotide en plus des amorces : une sonde. Cet oligonucléotide est marqué en 5' par une molécule fluorescente (fluorochrome) et en 3' par une molécule qui annule la fluorescence du fluorochrome par sa proximité (le quencher). La sonde est complémentaire d'une zone se trouvant entre les deux amorces. L'ADN polymérase utilisée lors de la PCR a une activité polymérase en 3' mais également exonucléase en 5'. La sonde est alors lysée à son passage et les deux extrémités éloignées. Le fluorochrome peut alors exprimer sa fluorescence. Le thermocycleur de PCR en temps réel est équipé d'une lampe à large spectre pouvant exciter les fluorochromes, et d'un capteur et de plusieurs filtres de couleurs différents pouvant isoler des longueurs d'ondes d'intérêt avant lecture. En effet, on peut faire synthétiser des sondes avec une multitude de fluorochromes (et quenchers compatibles). On peut alors réaliser une multiplexe c'est à dire dans un même tube, amplifier et lire les signaux de plusieurs cibles différentes selon les filtres disponibles.

La PCR en temps réel permet, grâce à des «copies» de la cible, de concentration connue (standard) diluées en cascade (gamme), de quantifier précisément un échantillon inconnu d'où son appellation de PCR quantitative ou qPCR.

Un des moyens d'obtenir un standard est d'isoler les ARN messagers et de les inclure dans des plasmides bactériens circulaires de concentration connue. Une gamme de ce standard permet de mettre au point les conditions des qPCR des cibles correspondantes. En effet on pourra déterminer les conditions optimales de celle-ci en trouvant une efficacité proche de 100 % de la PCR.

3.4.2 Choix du gène de référence

La quantification relative fait intervenir un gène de référence qui va servir de normalisateur. Ce gène est en effet considéré comme stable dans le modèle présenté, il ne subira alors pas de changement d'expression en fonction des conditions analysées. Ce gène de contrôle va permettre de compenser d'éventuels biais de PCR provenant de :

- variations dans la quantité et la qualité des échantillons
- rendement d'extraction différent entre échantillons
- variations dans les erreurs de pipetage
- variations d'efficacité de RT

Nous avons choisi GAPDH car il a été énormément utilisé dans des études d'expression

relative de gènes chez les vertébrés (Suzuki et al., 2000), en particulier dans l'étude de l'expression de cytokines de PBMC de chiens (Chamizo et al., 2001).

3.4.3 Extraction

Extraction

L'ARN total des culots de cellules provenant des stimulations (voir en détails les sections 3.2.4, 3.2.4, 3.2.4 et 3.2.4 pages 47, 47, 46 et 48) est purifié avec le kit iPrep purelink total RNA (INVITROGEN™) basé sur une technologie de micoparticules (1 μm de diamètre) de polymère sphériques superparamagnétiques de taille et de surface uniforme permettant une reproductibilité importante. Elles sont différemment sensibles en matière de capture des acides nucléiques en fonction des différents tampons en contact. En fonction des étapes d'extraction de l'ARN, elles sont, grâce à un aimant très puissant, isolées du tampon ce qui permet des lavages efficaces avec un minimum de contamination d'inhibiteurs. Lors de l'étape d'élution, les acides nucléiques se décrochent des billes dans 50 μL d'eau.

Un volume d'élution plus petit aurait été préférable mais l'appareil ne nous le permet pas avec ce kit.

Analyse des ARN

Les échantillons d'ARN sont analysés à l'aide d'un NanodropOne ((R) OZYME) par spectrophotométrie d'absorption.

Cet appareil fait traverser sur une distance fixe à travers un faible volume d'échantillon (micro goutte), un rayon lumineux provenant d'une lampe à décharge au xenon permettant une émission à large spectre.

Une analyse de l'absorbance (A) ou DO de l'échantillon permet d'obtenir des informations sur la concentration et la pureté de ce dernier.

En effet les acides nucléiques comme l'ARN ont une absorbance maximale à 260 nm, celle-ci (lorsque l'échantillon est pur) est proportionnelle à la concentration selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon.l.c$ où « l » est la distance traversée par la lumière émise, ϵ est le coefficient d'extinction molaire spécifique à sa longue d'onde d'absorption maximale (40 ng.cm/ μL pour l'ARN), et de la concentration de cette dernière.

D'autres substances pouvant se retrouver dans l'échantillon, ont une absorbance pouvant interférer sur le résultat de la concentration. Une contamination en protéine par exemple montrera un pic d'absorbance à 280 nm. Le ratio 260 nm/280 nm permet d'avoir une idée de l'importance de cette contamination. Un ratio acceptable se situe entre 2,0 et

2,2 pour l'ARN. Une contamination chimique avec des résidus de tampons de l'étape d'extraction par exemple, peuvent avoir un pic d'absorbance à 230 nm. Le ratio 260 nm/230 nm permet d'avoir une idée de la contamination. Il est idéal entre 2,0 et 2,2.

3.4.4 Rétrotranscription

Principe

Une PCR ne peut amplifier que de l'ADN. La première étape pour amplifier notre ARNm est de le rétrotranscrire en ADN complémentaire (ADNc) simple brin.

Le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase ((R) Thermofisher) est utilisé selon le protocole du fabricant à partir de 5 μ L d'ARN.

Il fait intervenir dans un premier temps une dsDNase (qui lyse les ADN double brin) qui élimine les traces d'ADN génomique pouvant inhiber la PCR, et les pseudogenes qui partagent les mêmes séquences en ADN que les ARNm cibles ([Johnson et al., 2004](#)) pouvant donc fausser le signal. La réaction se fait en 2 minutes à +37 °C.

Une transcriptase inverse (dérivée du virus de la leucémie murine ou M-MuLV) réalise ensuite la transcription dans un tampon contenant un inhibiteur de RNase protégeant la matrice des RNases A, B et C et un mix d'oligo (dT)₁₈ et d'amorces random hexamer pour des quantités d'ARN allant de 1 pg à 5 μ g. La réaction se fait 10 minutes à +25 °C suivie de 15 minutes à +50 °C pour finir avec une incubation de 5 minutes à +85 °C.

Les contrôles

On vérifie l'action de la dsDNase ainsi qu'une bonne conception d'amorces, lorsque la qPCR sur ARN, n'amplifie rien. On réalise alors lors de la rétrotranscription un contrôle sans enzyme de rétrotranscription, le «NoRT».

Le choix d'introduire systématiquement 5 μ L d'ARN sans prendre en compte le résultat du dosage peut être justifié.

En effet le même nombre de cellules est introduit dans les puits (distribution d'une suspension homogène) (voir section 3.2.2 page 44). De plus, les ARN sont extraits de façon automatisée. Finalement, les quantifications par PCR seront calibrées avec le gène de référence.

Egaliser les quantités d'ARN après stimulation, c'est effacer une éventuelle réaction de prolifération cellulaire donc une information.

Dans ce sens également, le dosage des ARN n'est pas précis parce que potentiellement pollué par des contaminants faussant légèrement les résultats du dosage (Voir section 3.4.3

page 57) et diluer des ARN c'est donc également diluer les contaminants qui n'auront pas la même concentration que les autres échantillons.

Ce choix de ne pas prendre en compte la quantité d'ARN lors de la rétro transcription sera à valider en analysant les Ct pour chaque traitement avec la cible GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase (GAPDH). Pour chacun, les Ct devront être très proches.

3.4.5 Conception des amorces

La méthode

Une première PCR en point final sera réalisée pour chaque transcrit dans le but d'en réaliser un clonage et construire un standard. On réalisera ensuite des qPCR en focalisant une petite zone de ces transcrits.

Le choix des amorces spécifiques d'un gène s'effectue à partir des séquences d'ADNc disponibles dans les bases de données nucléotidiques : <https://www.ensembl.org/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Les critères permettant de choisir les limites sont assez variables dans la littérature. J'ai choisi de suivre un compromis entre plusieurs chercheurs.

Les amorces sont sélectionnées à une longueur d'environ 20 nucléotides, dans l'optique également d'amplifier la longueur du transcrit complet pour la PCR point final et une zone de la séquence codante variant de 100 à 250 pb pour la PCR en temps réel.

La température d'hybridation (T_m) à leur complément, doit être comprise entre +50 et +75 °C.

Le pourcentage en Guanine et en Cytosine (% GC) doit être compris entre 40 et 60%. Les 5 dernières bases (en 3') ne doivent pas contenir plus de 2 G ou C.

La formation théorique de boucles (hairpin) pourrait nuire à l'efficacité des PCR. Les configurations théoriques des boucles, peuvent être étudiées et la température d'hybridation correspondante minimisées si inférieure à +40 °C. De même les amorces peuvent s'apparier entre elles (self dimer). L'énergie correspondante (DeltaG) s'exprime en kcal/mole et doit être supérieure à -6kcal/mole. Ces critères sont vérifiés avec ces outils en lignes : OligoAnalyzer r Tool et PrimerQuestTool (IDT).

La spécificité (longueur et nombre de fragments obtenus, formation de dimères) est testée grâce aux logiciels Primer 3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012), BLAST (Basic Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Dans la mesure du possible, les couples d'amorces pour la qPCR sont choisis de part et d'autre d'un intron afin de pouvoir distinguer une éventuelle co-amplification d'ADN génomique.

En ce qui concerne les sondes, on ajoute d'autres critères. Ainsi le T_m doit être entre 8 et 10 °C de plus en moyenne que celle des amorces. On évite un G ou C en 5'.

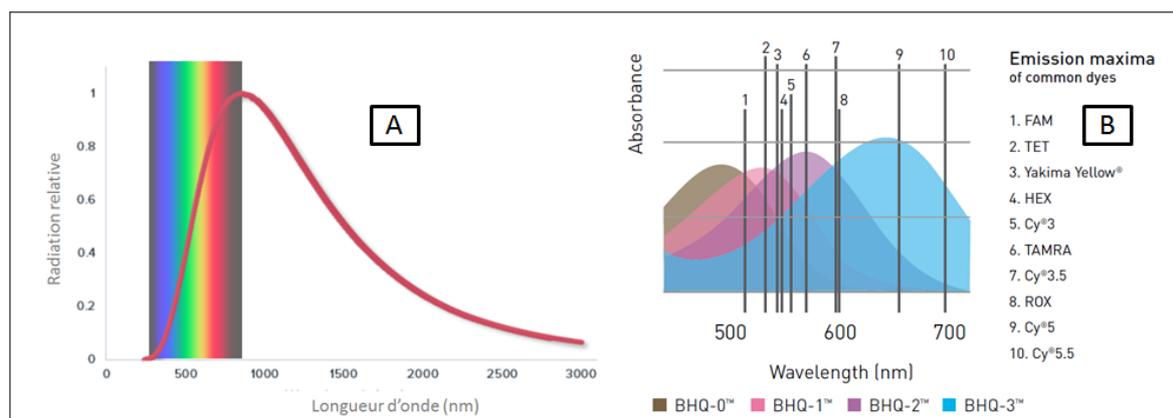


FIGURE 3.8 – **Choix des fluorochromes et quencher.** **A** : Spectre d'excitation de la lampe tungsten halogen du thermocycleur temps réel MX3005P. Les sondes ont des fluorochromes dont l'excitation se fait dans le visible (380nm à 780nm) ; **B** : Spectres d'absorbance des quenchers de la famille des BHQ. Les pics d'émission de certains fluorochromes ont été représentés (barres verticales. source : <https://secure.eurogentec.com/>

Application

Le chien a 39 paires de chromosomes.

Le gène de l'IFN γ de 4,83 kb (Voir annexe 14) se situe sur le chromosome 10. Son transcrit *NM₀01003174* de 1223 bp comporte 4 exons (Voir annexe 11) et code pour une protéine de 166 acides aminés.

Le gène de l'IL-4 de 8,84 kb (Voir annexe 15) est situé sur le chromosome 11. Son transcrit *NM₀01003159* de 560 bp comporte 4 exons (voir annexe 12) et code pour une protéine de 132 acides aminés.

Le gène de GAPDH de 3,46 kb (Voir annexe 16) se situe sur le chromosome 27. Son transcrit *NM₀01003142* de 993 bp comporte 10 exons (Voir annexe 13) et code pour une protéine de 330 acides aminés.

Les caractéristiques des amorces et les conditions de PCR sont indiquées ci-dessous (Voir tableau 3.2 et tableau 3.3 page 61).

Toutes les amorces et sondes ont été synthétisées par un prestataire (EUROFINS Genomics) avec une purification sur colonne HPCL.

Pour chaque couple d'amorces, les conditions de PCR (température d'hybridation et nombre de cycles) ont été optimisées.

Une lampe tungsten halogen émet un spectre continu dans le visible (de 380 nm à 780 nm) (Voir figure 3.8A) et permet d'exciter un certain nombre de fluorochromes (molécule

Tableau 3.2 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des amorces d’amplification des transcrits

Cible	Oligo	Séquence 5' - 3'	Taille
IFN γ	Sens	GCC TAA CTC TCT GAA ACG ATG	1020 pb
	Antisens	TGG GTA CAG TCA TAG TTG TC	
IL-4	Sens	ATT GTG AGC CTC TCC TAG TA	465 pb
	Antisens	GCT TCA ATG CCT GTA GTA T	
GAPDH	Sens	ATG GTG AAG GTC GGA GTC AAC	961 pb
	Antisens	GTT GCT GTA GCC AAA TTC AT	

Tableau 3.3 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des amorces de qPCR

Cible	Oligo ¹	Séquence 5' - 3'	Taille	Site ²	Tm	GC%
IFN γ	Sens	AGG AAG CGG AAA AGG AGT CA	67 pb	(553 \rightarrow 573)	56	50
	Antisens	GGC AGG ATG ACC ATT ATT TCG		(619 \leftarrow 599)	54	47.6
	Sonde	TGC TCT GCG GCC TCG AAA CAG A		(597 \leftarrow 576)	63.3	59.1
IL-4	Sens	TGG CAA ACA AGA CCT GTT CTA	106 pb	(362 \rightarrow 382)	62	42.9
	Antisens	CTT CAA TGC CTG TAG TAT TTC TTC TG		(467 \leftarrow 442)	62	38.5
	Sonde	AGT ACA CTG AAA GAC TTC TTG GAA AGG CT		(400 \rightarrow 428)	68	41.4
GAPDH	Sens	GAT TCT ACC CAC GGC AAA TTC	97 pb	(142 \rightarrow 163)	61	47.6
	Antisens	GAT CTC GCT CCT GGA AGA TG		(239 \leftarrow 219)	62	55
	Sonde	ACG GGA AAC TTG TCA TCA ACG GGA		(185 \rightarrow 200)	68	50

¹ fluorochrome 5'-3'Quencher : HEX-BHQ2 [IFN γ], FAM-BHQ1 [IL-4], CY5-BHQ3 [GAPDH]

² Référence aux transcrit AF126247 [IFN γ], AF187322 [IL-4], AB038240.1 [GAPDH]

fluorescente). Ces derniers vont émettre une fluorescence d'un spectre de longueur d'onde plus grande (les fluorescences d'émission). Ces derniers doivent être absorbés par des quenchers associés, en 3' de l'amorce (Voir figure 3.8B page 60).

Les fluorochromes et quenchers ont été choisis dans une éventuelle future multiplexe. Ainsi leurs signaux d'émissions ne se chevauchent pas. Pour IFN γ on a flanqué en 5' du fluorochrome HEX (excitation/emission : 535 nm/555 nm) et en 3' du quencher BHQ2 (pic d'absorbance à 580 nm). Pour IL-4 la sonde comporte en 5' le fluorochrome FAM (excitation/emission : 492 nm/516 nm) et en 3' du quencher BHQ1 (pic d'absorbance à 534 nm). La sonde de GAPDH est flanquée en 5' du fluorochrome CY5 (excitation/emission : 635 nm/665 nm) et en 3' du quencher BHQ3 (pic d'absorbance à 670 nm).

3.4.6 Conditions de PCR

Amplification des transcrits

Les amplifications des transcrits de IFN γ , IL-4 et GAPDH sont réalisées à l'aide de la TaqPlatinum™ (INVITROGEN) qui est une ADN polymérase hot start c'est-à-dire qu'elle est associée, à température ambiante, à un anticorps monoclonal qui la bloque. Cet anticorps la libère à +94 °C lors d'une activation initiale.

Un master mix de 18 μL est réalisé et 2 μL de cDNA sont introduits à la réaction, les conditions de PCR ont été alors optimisées pour obtenir à la révélation, une bande marquée et isolée.

Les programmes de PCR sont mis en oeuvre dans le Verity® Thermal Cycler (Applied Biosystems™).

On fait migrer les produits de PCR dans un gel d'agarose (2 % dans du tampon TAE) avec un marqueur de taille 1 kb DNA ladder (Promega Corporation). Une fois la taille de la bande visualisée et contrôlée (voir tableau 3.2), on la découpe et réalise une purification du produit de PCR avec le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel) dont on suit le protocole du fabricant. Les produits de PCR purifiés sont ensuite prêts à être intégrés dans un plasmide (voir section 3.4.7 page 63)

IFN γ et IL-4 On utilise une concentration en MgCl₂ finale de 1,5 mM, un mix de dNTP à 250 μM finale et 0,125 μL de TaqPlatinum dans le tampon 1x, qsp 18 μL d'eau libre de DNase. Les amorces sont utilisées à 600 nM final.

Après une activation initiale de la PCR à +94 °C 2 minutes, on réalise 13 cycles de trois étapes : une dénaturation à +94 °C durant 30 secondes, un « touch down » allant de +66 °C à +54 °C, 30 secondes à chaque température et enfin une étape d'extension à +72 °C pendant 2 minutes. Ensuite on réalise 32 cycles de trois étapes : une étape de dénaturation à +94 °C 30 secondes, une étape d'hybridation de +60 °C pendant 30 secondes et enfin une extension +72 °C pendant 2 minutes. La PCR se termine par une étape d'extension finale à +72 °C pendant 10 minutes.

GAPDH On utilise une concentration en MgCl₂ finale de 1 mM, un mix de dNTP à 250 μM finale et 0,25 μL de TaqPlatinum dans le tampon 1x, qsp 18 μL d'eau libre de DNase. Les amorces sont utilisées à 2.5 μM final.

Après une activation initiale de la PCR à +94 °C 5 minutes, on réalise 45 cycles de trois étapes : une dénaturation à +94 °C durant 30 secondes, une hybridation à +63 °C 30 secondes et enfin une étape d'extension à +72 °C pendant 1 minute 30 secondes. La PCR se termine par une extension +72 °C pendant 10 minutes.

qPCR

Les qPCR sont réalisées à l'aide du kit Maxima probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific™) dont le tampon ne contient pas de ROX (molécule fluorescente optionnelle permettant de normaliser le signal en cas de variation de pipettage, nous ne l'utilisons pas).

Un master mix de 18 μL est réalisé et 2 μL de cDNA dilué au demi (pour éviter les inhibitions dûes au tampon de RT (voir section 3.4.4 page 58) sont introduits à la réaction, les conditions de PCR ont été alors optimisées.

En ce qui concerne le milieu réactionnel, on utilise le tampon du kit à raison de 12.5 μL pour un volume final de 25 μL . On teste deux concentrations (0.1 nM et 0.2 nM final) pour les amorces et les sondes. De l'eau DNase free complète le volume. On réalise la qPCR en duplicat pour chaque échantillon. Les concentrations retenues seront sélectionnées en fonction de l'efficacité la plus proche de 100% (voir section 3.4.8 page 66). Pour cela on fait des dilutions de plasmides en cascade au dixième.

Les programmes de PCR sont mis en oeuvre dans le MX3005[®] P (Applied Biosystems[™]) et les filtres de lectures sont FAM pour IL-4, CY5 pour GAPDH et HEX pour IFN γ .

Après une dénaturation initiale de la PCR à +95 °C 10 minutes, on réalise 40 cycles de deux étapes : une dénaturation à +95 °C durant 15 secondes puis une hybridation/extension à +60 °C 60 secondes. A la fin de chacun des cycles, l'appareil fait une mesure de la fluorescence et l'enregistre.

3.4.7 Construction des standards par clonage

On réalise une construction moléculaire intégrant les transcrits amplifiés, dans des plasmides circulaires que l'on va multiplier par clonage. Après purification, on pourra calculer la concentration en copies du transcrit.

Insertion

Principe Un plasmide est un ADN double brin circulaire bactérien. Il a la particularité d'être multiplié par la machinerie cellulaire bactérienne. Cette dernière crée alors des clones de ce plasmide.

Des plasmides non linéaires (ouverts) sont fabriqués par biotechnologie pour être utilisés comme outil. Ils comportent beaucoup de gènes et marqueurs génétiques pouvant être reconnus et utilisés par des enzymes et autres facteurs de transcriptions de bactéries.

Les produits de PCR (section 3.4.6) sont insérés dans un plasmide linéaire. L'accrochage de cet insert circularisera le plasmide.

Pour le projet, on utilise le plasmide pJET1.2/blunt du kit CloneJET PCR Cloning Kit (référence K1232, *ThermoFischer SCIENTIFIC*[™]) (Voir figure annexe 6).

Il est terminé à ses deux extrémités par des bouts francs (absence de bases libres), et comporte un gène létal d'une endonucléase ECO47IR au milieu duquel le plasmide est linéarisé. Si l'insert n'est pas intégré, le plasmide autocircularisé sera exploité par la bactérie qui traduira le gène de l'endonucléase et mourra.

Protocole Une réaction d'élimination des bouts francs (ou réaction «blunt») de l'insert, est réalisé à partir de 2 μL de produit de PCR. Un milieu réactionnel (18 μL) est composé de 10 μL de tampon de réaction 2x, 1 μL d'enzyme «DNA blunt». Le tout est incubé à +70 °C pendant 5 minutes puis placé sur la glace.

La réaction de ligation s'effectue à partir de 2 μL de la réaction de «blunt» auxquels on ajoute 1 μL de pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ μL) et 1 μL d'enzyme T4 DNA ligase. Le tout est incubé à +22 °C pendant 5 minutes.

Transformation bactérienne

Principe Une bactérie compétente (dont les propriétés ont été modifiées pour pouvoir accueillir des plasmides artificiels, est transformée c'est à dire qu'elle intègre le plasmide d'intérêt.

Elles sont étalées sur un milieu nutritif riche solide (LB AGAR) en présence d'un antibiotique contre lequel les plasmides comportent un gène de résistance permettant à leur bactérie hôte de résister contrairement à des bactéries opportunistes.

Ici on utilise la Bactérie One Shot® TOP10 (référence C4040-10, Life technologies™) qui va intégrer le plasmide suite à un choc thermique. Après une nuit à +37 °C, des colonies (ensemble de bactéries provenant toutes d'un même individu) sont visible sous forme de petits points. Le plasmide contenu dans ces clones est exactement le même pour tous.

Protocole 3 μL de produit de ligation sont transférés dans 50 μL (un tube) de bactéries compétentes. Une incubation sur la glace de 20 minutes est suivie d'un choc thermique à +42 °C pendant 30 secondes entraînant l'intégration du plasmide à travers les pores ouverts de la bactérie compétente. Après une incubation sur la glace durant 2 minutes, 500 μL d'un milieu très nutritif liquide permettant à la bactérie de reformer sa paroi (SOC medium) sont ajoutés et les tubes sont mis sous une agitation de 300 rpm à +37 °C durant 30 min.

Les cellules sont étalées sur une boîte de Pétri de 20 cm précoulée avec un milieu très nutritif solide (LB AGAR) en présence de 50 μL d'ampiciline. La boîte est incubée à +37 °C sur la nuit.

Sélection et criblage

Les bactéries sont testées par PCR pour vérifier que l'insert ait intégré le bon produit amplifié.

Quelques colonies sont sélectionnées individuellement à l'aide d'une pipette que l'on trempe dans 20 μL de milieu nutritif liquide (LB Broth). Après prélèvement de 1 μL pour PCR de criblage, on ajoute du milieu LB Broth et on place les tubes sous agitation à +37 °C sur la nuit.

La réaction se fait à partir de 1 μL de bactérie en suspension. Le milieu réactionnel de la PCR de criblage est réalisé avec la Platinum™ Taq DNA Polymerase 5 U/ μL (référence 10966034 , Thermo Fisher Scientific) est composé de tampon de 2 μL de PCR 10x, 1,2 μL de MgCl_2 25 mM, 2 μL de dNTP 2 mM, 0,4 μL des amorces du kit (pJET1.2 forward et reverse sequencing primer), 0,1 μL de Taq et de l'eau ultrapure qsp 20 μL .

Le programme de PCR est une activation initiale de 3 minutes à +95 °C puis 35 cycles d'une dénaturation à +94 °C durant 30 secondes, une hybridation à +60 °C 30 secondes et une extension de 2 minutes à +72 °C.

La taille des produits de PCR est vérifiée sur un gel d'agarose 2%, puis on le fait séquençer (Beckman Coulter Genomics). On réalise un alignement avec des séquences connues avec le logiciel VNTi© (INVITROGEN™).

La multiplication et la purification plasmidique

Les clones d'intérêt sont ensuite cultivés dans un milieu nutritif riche liquide (LB Broth) afin de se multiplier et de multiplier en même temps le plasmide correspondant.

Lorsque la densité optimale de bactéries est atteinte (on peut, pour plus de précision la mesurer avec un spectrophotomètre à 620 nm), on effectue une purification plasmidique sur colonne, avec le kit fast plasmid mini kit (5 Prime™).

Le dosage et calcul du nombre de copies

Le dosage permet d'obtenir une concentration en " $\text{ng}/\mu\text{L}$ ". On peut calculer avec une formule mathématique, le nombre de copies de notre insert par μL par exemple.

Les dosages des plasmides ont été effectués à l'aide du spectrophotomètre Qubit (INVITROGEN). Le principe est l'insertion d'une sonde moléculaire fluorescente et spécifique du double brin d'ADN (kit dsDNA Qubit assay), et d'en mesurer la fluorescence. Celle-ci est comparée à une gamme de concentrations connues et on peut alors mesurer la concentration en ADN double brin de nos échantillons.

Le plasmide et son insert mesurent exactement $1020 + 2974 = 3994$ pb pour $\text{IFN}\gamma$, $465 + 2974 = 3439$ pb pour IL-4 et $898 + 2974 = 3872$ pb pour GAPDH.

On considère qu'une paire de base pèse 650 Daltons donc une mole pèse 650 g et en sachant que la constante d'Avogadro est de $6,022 \cdot 10^{23}$ molécules/mole, le nombre de copies peut être estimé en utilisant cette formule :

$$\text{Nombre de copies} = \frac{\text{Quantité d'ADN (ng)} \times 6,022.10^{23}}{\text{Longueur du plasmide (pb)} \times 10^9 \times 650} \quad (3.1)$$

3.4.8 Analyse des données brutes de qPCR et détermination des efficacités

Analyse des données brutes de qPCR

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

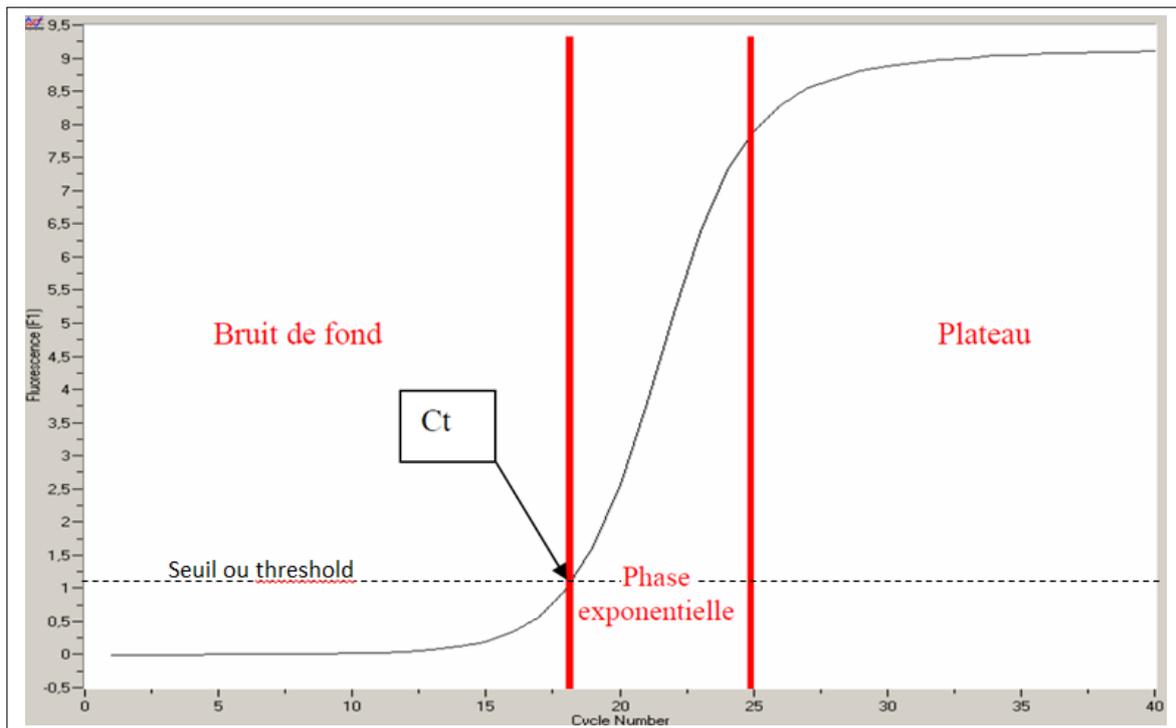


FIGURE 3.9 – Les différentes phases de l'amplification d'ADN par qPCR. (Figure inspirée des «Principes de la PCRq» <https://www.institutcochin.fr/>)

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une qPCR, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (figure 3.9) :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié

double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

Le seuil (ou threshold) va être dépassé par le signal à un certain nombre de cycles : le nombre de cycles correspondant est le Ct (ou cycle de threshold). Cette valeur est directement proportionnelle avec le nombre de copies (ou quantité d'ARN ou d'ADNc initial).

Détermination des efficacités

La droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log base 10 de la concentration initiale en molécules cibles. Le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard.

Les efficacités observées doivent suivre une augmentation de 3,4 Ct pour une dilution au dixième de la quantité de cible. Les amorces peuvent alors être utilisées dans les conditions de l'essai, pour quantifier les ARNm cibles.

Pour déterminer ces efficacités, on réalise ces dilutions pour un échantillon, et on réalise une qPCR. Les Ct obtenus sont corrélés sur un graphique : nombre de copies (ou quantité d'ARN ou de cDNA) introduit en fonction du Ct. La pente de la droite donne l'efficacité par les formules 3.2 et 3.3.

Les efficacités des cibles IFN γ et IL-4 doivent être proches de celle de GAPDH (voir 3.4.2) (Johnson et al., 2014), pour pouvoir en mesurer l'expression.

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Pente}}} \quad (3.2)$$

$$E (\%) = (E - 1) \times 100 \quad (3.3)$$

3.4.9 Mesure de l'expression des gènes

On utilise la méthode de quantification relative normalisée par un calibrateur (Pfaffl, 2001) (<http://www.gene-quantification.info/>) ou $\Delta\Delta\text{Ct}$.

L'expression de gènes cibles et de référence, est fonction de l'efficacité de la PCR et du Ct enregistré. Avec cette technique, nous n'avons pas besoin d'une droite standard pour chaque run, il n'est pas nécessaire de connaître la valeur absolue du nombre de copies des échantillons. Les résultats sont exprimés par un rapport cible/référence de chaque échantillon normalisé par le rapport cible/référence d'un échantillon appelé calibrateur. Dans cette méthode, la précision du résultat dépend des efficacités de PCR des gènes cibles et référence.

Ces 2 efficacités doivent être les plus proches l'une de l'autre.

Il est important, pour valider cette méthode de quantification, de prouver que les efficacités de PCR de la cible et de la référence sont très proches. Un moyen de le prouver est de calculer les ΔCt en fonction des dilutions successives d'un même échantillon.

La valeur absolue de la pente $\Delta Ct = f(\text{dilution de l'échantillon})$ doit être inférieure à 0,1. Une fois validée, on peut utiliser la méthode des $\Delta\Delta Ct$ pour la quantification relative sans avoir à créer de courbes standards en parallèle.

Principes :

1. Dans une première étape, le rapport cible/référence pour chaque échantillon et l'échantillon calibrateur est calculé. Les biais liés aux différences de qualités et quantités des échantillons sont éliminés (le biais est le même pour la cible et pour la référence et donc s'annule).
2. Dans une seconde étape, le rapport obtenu pour chaque échantillon est divisé par le rapport obtenu pour l'échantillon calibrateur. Les biais liés aux différences de sensibilité dans la détection du gène cible et référence vont alors s'annuler. La normalisation par l'échantillon calibrateur permet de comparer les échantillons entre eux grâce à un Ratio.

Ces principes sont appliqués avec cette équation (Pfaffl, 2001) :

$$\frac{E_{\text{Cible}}^{\Delta Ct(\text{Calibrateur-Stimulé})}}{E_{\text{Ref}}^{\Delta Ct(\text{Calibrateur-Stimulé})}} \quad (3.4)$$

3.5 Les analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques de ce projet concernent un faible nombre d'échantillons. Tous les tests effectués sont de type non paramétriques.

Certains tests concernent une comparaison entre la réponse d'une même suspension cellulaire avant et après traitement. On effectuera alors un test des rangs signés de Wilcoxon car on considère les échantillons comme appariés.

Pour comparer les réponses entre des échantillons différents (animaux différents par exemples, on vérifie que des différences sont significatives avec un test de Mann-Whitney.

Les représentations graphiques ainsi que les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel Prism[®] 6 (GraphPad[®] Software Inc.)

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1 Validation de la qPCR

Mesure des efficacités sur dilutions de plasmides. Dans le cadre de l'optimisation de la qPCR, différentes concentrations d'amorces et de sondes sont testées sur des dilutions en cascade des différents plasmides (section 3.4.7 page 63). On en mesure systématiquement les efficacités (section 3.4.8 page 67). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 – Variation des concentrations en amorces et sonde. Conséquence sur l'efficacité de la qPCR.

Concentrations (μM)		Efficacités (%)		
Sonde	Amorce	IL-4	IFN γ	GAPDH
0.1	0.1	84.7	105.1	Infini
0.2	0.1	106.3	108.4	Infini
0.1	0.2	83.9	117.5	109
0.2	0.2	94	124.3	99.2

En ce qui concerne IFN γ , une concentration de 0.1 μM pour les amorces comme pour la sonde, donne une efficacité plus proche de 100 % (105,1 %) que les trois autres combinaisons (108.4 %, 117.5 %, 124.3 %). Dans le cas d'IL-4 comme GAPDH, 0.2 μM de concentration finale pour les amorces et les sondes contribue à une efficacité de PCR plus proche de 100 % (94 % pour IL-4 et 99.2 % pour GAPDH) que les trois autres combinaisons (84.7 %, 106.3 % et 83.9 % pour IL-4, et 109 % pour GAPDH, une concentration d'amorces de 0.1 μM ne donne aucun résultat).

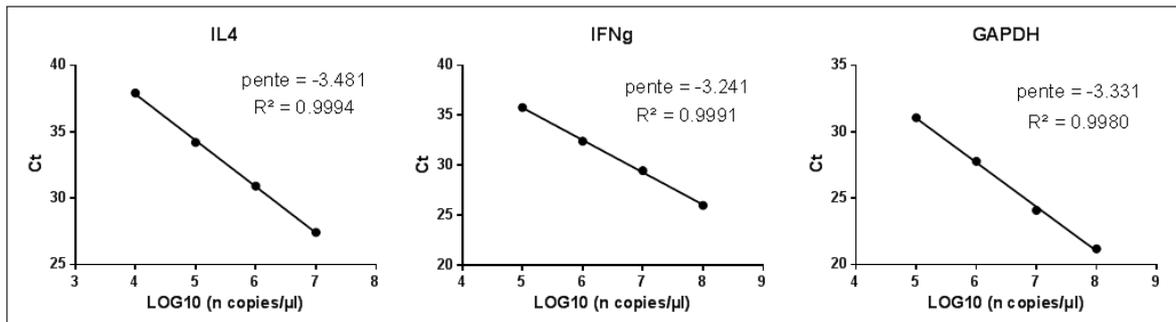


FIGURE 4.1 – **Efficacité des PCR sur plasmides.** Ct obtenus après amplification des cibles IFN γ (concentrations finales en amorces et sonde de 0.1 μM), IL-4 et GAPDH (avec concentrations finales en amorces et sonde de 0.2 μM), en fonction du nombre de copies des plasmides dilués en cascade au dixième.

La représentation des Ct, en fonction de la concentration en plasmides (logarithme en base 10 du nombre de copies/ μL) amplifiés par des qPCR optimisées nous permet

d'observer figure 4.1, une corrélation importante (R^2 proche de 1 pour les 3 cibles)¹ avec des concentrations en amorces et en sonde de 0.1 μM pour IFN γ , et de 0.2 μM pour IL-4 et GAPDH.

En ce qui concerne IFN γ , entre 10^5 et 10^8 copies/ μL , la pente de la droite est de -3,241 ce qui correspond à une efficacité de 2,05 soit 105 % (selon les formules 3.2 et 3.3 page 67).

Pour IL-4, entre 10^4 et 10^7 copies/ μL , on observe une pente de -3,481 ce qui fait une efficacité de 1,94 soit 94 %.

Pour GAPDH, entre 10^5 et 10^8 copies/ μL , la pente est de -3,331, ce qui correspond à une efficacité de 2,00 soit 100 %.

Mesure des efficacités sur dilutions de cDNA. Des dilutions de cDNA sont ensuite réalisées (voir section 3.4.4 page 58) à partir d'ARN extrait (voir section 3.4.3 page 57) de PBMC de chiens (protocole 2b, prélèvement sanguin de J13, section 3.1.4 page 32), et les qPCR réalisées selon la méthode optimisée.

Aucun des ARN rétrotranscrits sans la présence de rétrotranscriptase (NoRT), n'a présenté d'amplification (absence de Ct) et ce, quelle que soit la cible. Le traitement à la DNase lors de la rétrotranscription, est suffisant pour éliminer toute amplification génomique.

Les Ct ont été représentés figure 4.2, en fonction du logarithme en base 10 de la concentration en nanogrammes par microlitre d'ARN total (de l'échantillon initial et de ses concentrations théoriques après dilutions en cascade).

Les résultats figure 4.2 représentant les Ct en fonction du logarithme en base 10 de la concentration en nanogrammes par microlitre d'ARN total (de l'échantillon initial et de ses concentrations théoriques après dilutions en cascade), permettent d'observer des corrélations importantes (R^2 proche de 1) pour les 3 cibles.

Une pente de -3,608 pour IFN γ entre 0.01116 ng/ μL et 27,9 ng/ μL (Ct allant de 25.5 à 37.9) permet de calculer une efficacité de 1,89 soit 89 %.

En ce qui concerne IL-4, une pente de -3,2777 correspond à une efficacité de 2,02 soit 102 % constatée entre 0.01116 ng/ μL et 27,9 ng/ μL (Ct allant de 25.7 à 33.3).

Pour GAPDH, une pente de -3,3567 correspond à une efficacité de 1,99 soit 99 % est observée entre 0.00112 ng/ μL et 27,9 ng/ μL (Ct allant de 21.9 à 36.9).

Ces efficacités, proches de 100 % (ou 2), sont utilisées dans les calculs d'expression des gènes cibles décrits section 3.4.9 page 67) dans la formule 3.4.9 : en résumé pour IFN γ : 1.89, pour IL-4 : 2.02 et pour GAPDH : 1.99.

1. Plus le coefficient de corrélation R^2 est proche de 1 plus les points sont alignés sur une droite

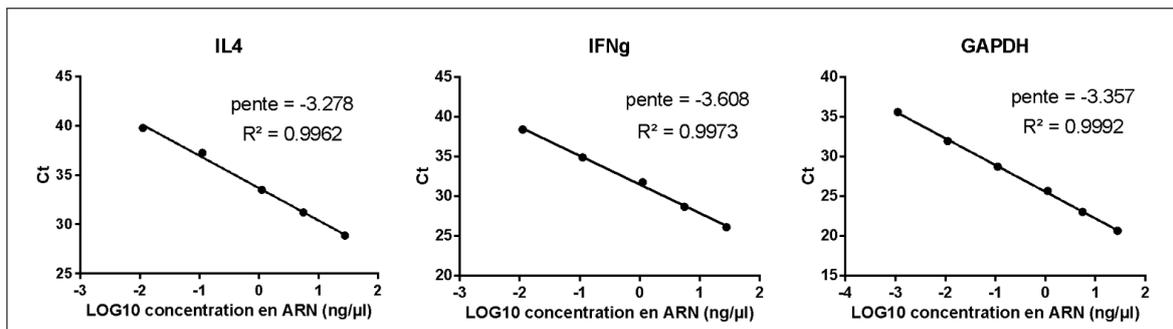


FIGURE 4.2 – **Efficacité des PCR sur cDNA.** Ct obtenus après amplification des cibles IFN γ (concentrations finales en amorces et sonde de $0.1\mu\text{M}$), IL-4 et GAPDH (avec concentrations finales en amorces et sonde de $0.2\mu\text{M}$), en fonction de la concentration en ARN théorique correspondant aux cDNA pur, dilués en cascade au dixième.

Ces efficacités correspondent à des gammes de Ct allant de 26.4 à 38.4 pour IFNg, de 28.9 à 39.8 pour IL-4 et de 20.6 à 31.9 pour GAPDH représentant les limites de l'utilisation de cette méthode.

4.2 Profil d'expression des cytokines après stimulation polyclonale

Une étude dose réponse est réalisée, en stimulant *in vitro* 2.10^6 PBMC des chiens du protocole clinique 2b prélèvement sanguin J3 (section 3.1.4 page 32), avec des concentrations croissantes en ConA, durant 6 h.

Les résultats de qPCR figure 4.3, permettent d'observer une augmentation de l'expression de IFN γ et IL-4, avec l'augmentation de la concentration en concanavaleine A. Un maximum d'expression est observable à une concentration de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ratio de 1250 pour IL-4 et 950 pour IFN γ). Un ratio de 400 pour IL-4 et 250 pour IFN γ est également significatif avec une concentration de 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

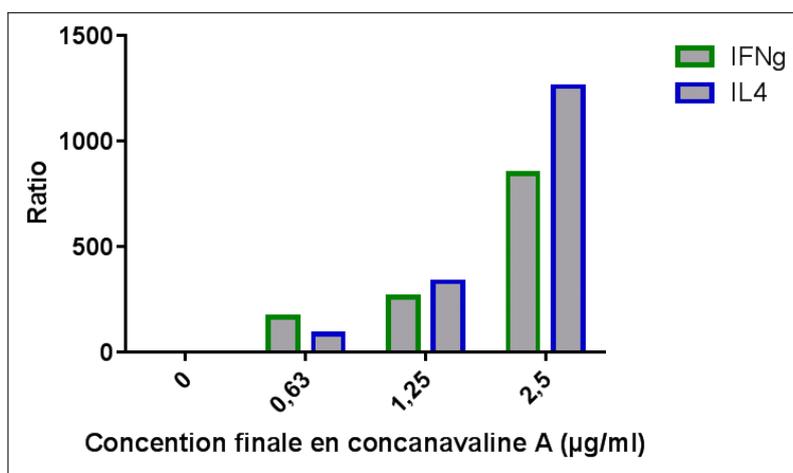


FIGURE 4.3 – Variation de l'expression des gènes de IFN γ et IL-4 lors d'une étude réponse à la concanavaleine A après 6h d'incubation Graphique représentant les ratios en fonction de la concentration en ConA. Les barres représentent les médianes et les traits horizontaux représentent les écarts interquartiles. Les écarts sont significatifs à une erreur de 5 %. Une ligne discontinue représente un ratio de 2. Certains scientifiques admettent comme significatif un ratio supérieur à 2.

Une cinétique a été réalisée sur les mêmes cellules que précédemment à une concentration finale en ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant, 6 h, 24 h et 48 h.

Une très forte surexpression de IFN γ et IL-4, est observée figure 4.4 avec une concentration de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConA à 6 h (ratio supérieur à 900), 24 h et 48 h (significatives supérieures à un facteur 30).

la qPCR dans les conditions décrites plus haut, nous permet de mesurer une surexpression des transcrits de IFN γ et IL-4 après stimulation des PBMC avec un antigène polyclonal.

Des études dose réponse à la ConA et une cinétique, ont permis de déterminer que

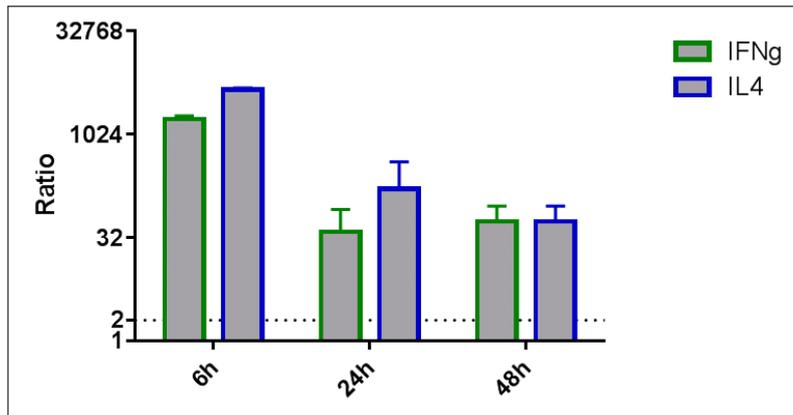


FIGURE 4.4 – Cinétique d'expression de IFN γ et IL-4 en fonction du temps après stimulation avec une concentration finale en ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Graphique représentant les ratios en fonction du temps. Les barres représentent les médianes et les barres horizontales, les écarts interquartiles. Les écarts sont significatifs à une erreur de 5 %. Une ligne discontinue représente un ratio de 2. Certains scientifiques admettent comme significatif un ratio supérieur à 2.

l'utilisation de la ConA comme contrôle positif de la qualité des cellules et de la stimulation semble possible avec une concentration finale en ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 6 h d'incubation, 24 h ou 48 h, voir 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 6 h.

Ces résultats sont en adéquation totale avec une étude équivalente réalisée par RT-qPCR sur des cellules de chiens, avec un autre gène de référence (β -Actine) (Saldarriaga et al., 2006).

Les méthodes de prélèvement sanguin, isolement de PBMC, congélation et décongélation mises en place sur les cellules du protocole 2b, semblent adaptées car elles ont été capables de préserver les capacités des PBMC à recruter leur fonction sécrétrices de cytokines et ce, après quatre années de stockage en azote liquide.

4.3 Profil d'expression des cytokines après stimulation spécifique

Validation des cellules et de l'antigène de référence Un ELISPOT IFN γ (protocole décrit section 3.3.5 page 52) est réalisé sur les PBMC des animaux du protocole clinique 1 (section 3.1.3 page 31) dans les conditions de stimulations décrites section 3.2.4 page 46.

Préalablement, les PBMC sont analysées après isolement (protocole technique section 3.2.1 page 38), avec la technique du marquage au VIVID pour cytomètre en flux (voir section 3.2.1 page 42).

Les résultats du test VIVID (figure 4.5 nous permet de voir sur la figure de gauche, la présence de nombreux lymphocytes (SSC entre 0K et 50K, FSC entre 50K et 100K) et de monocytes (SSC entre 100K et 250K, FSC entre 80K et 150K). Ces deux populations représentent environ 67 % des cellules. On constate quelques débris cellulaires (SSC entre 0K et 50K, FSC entre 0K et 50K).

Ces proportions sont comparables à celles des PBMC Humaines selon [Silva et al. \(2013\)](#).

Lorsque l'on focalise l'analyse du marquage au VIVID sur les lymphocytes et monocytes (figure 4.5 droite), on constate une très faible mortalité (environ 0,237 %).

Ces résultats sont comparables pour tous les animaux de ce protocole)

En ce qui concerne les résultats bruts de l'ELISPOT (tableau 4.2 et photos figure 8 en annexe) les puits des cellules non stimulées présentent entre 0 et 4 spots pour les chiens vaccinés (2 ou 3 spots en moyenne) et 0 spot pour les 2 puits concernant les chiens naïfs. Le PA FCV fait apparaître 2 spots dans un puits seulement (animal 1), pour ce qui est des chiens vaccinés et aucun pour les chiens non vaccinés.

Tableau 4.2 – **Nombre de spots obtenus lors de l'essai avec les cellules de référence.** Données brutes après passage au lecteur automatique et réinterprétation d'un technicien expérimenté.

Traitement \ Animaux	Vaccinés				Naïfs	
	1	2	3	4	1	2
NA	4	1	0	4	0	0
FCV	2	0	0	0	0	0
PA rage	28	11	19	18	0	1
PMA/iono	79	52	33	64	31	72

Les puits ayant contenu les PBMC des chiens vaccinés et non vaccinés, stimulés avec PMA/iono semblent montrer un nombre important de spots : entre 33 et 79 (moyenne de

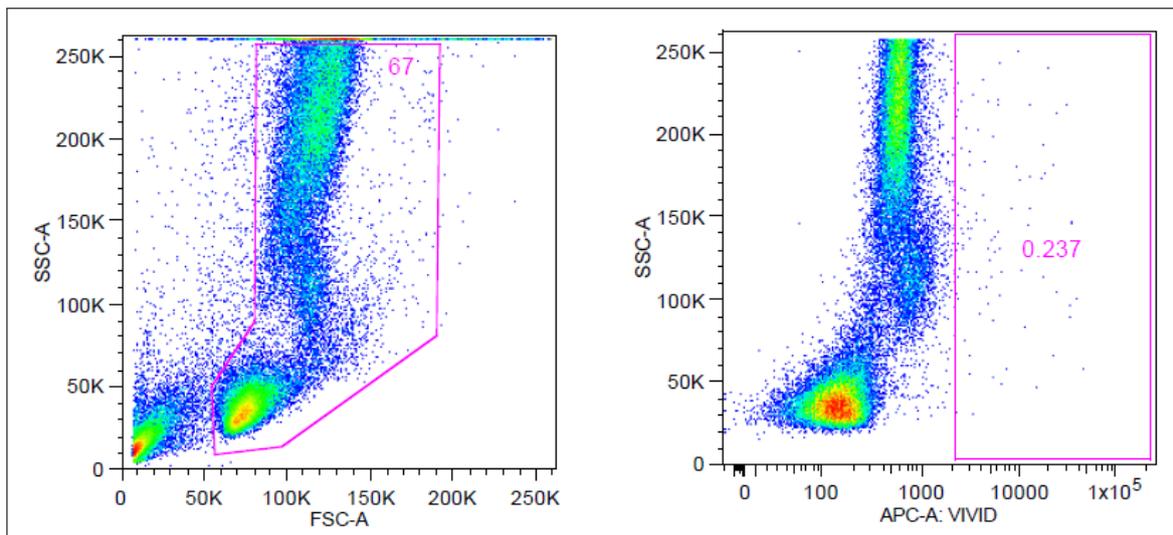


FIGURE 4.5 – **Caractérisation des cellules de référence.** Coloration spécifique au marqueur VIVID et mesure par cytométrie en flux. Chaque point représente une cellule. Dans le cadre de gauche : Les cellules sont placées selon leur complexité des cellules ou granulométrie (FSC-A en abscisse) et leur taille (SSC-A en ordonnée). Dans le cadre de droite : Les cellules sont placées selon leur rayonnement (APC-A VIVID en abscisse) et leur taille (SSC-A en ordonnée).

57) pour les chiens vaccinés et 31 et 72 pour les chiens naïfs (moyenne de 51).

Les cellules de chiens vaccinés semblent avoir fortement répondu avec le PA rage avec un minimum de 11 spots et un maximum de 28. Quant aux PBMC des chiens non vaccinés, un seul puits ne présente qu'un seul spot (voir résultats bruts tableau 4.2).

En ce qui concerne les cellules non stimulées et ce, quel que soit le statut vaccinal des chiens, avec un nombre de spots compris entre 0 et 4 spots, on considère ces résultats comme le bruit de fond dû à la manipulation en elle-même ainsi qu'aux interprétations de lecture de l'opérateur.

La variation du nombre de spots pour FCV se trouve dans le bruit de fond et l'on considère donc une réponse non représentative. Ce point est confirmé pour les chiens vaccinés, par l'analyse statistique qui ne montre pas de différence significative avec le groupe de cellules non stimulées. En ce qui concerne les chiens non vaccinés, on peut réaliser un test de Mann-Whitney entre la réponse FCV des chiens vaccinés et celle des chiens non vaccinés. Ce traitement ne montre pas de différence significative cependant, ce test n'est pas très robuste (test au risque $\alpha = 20\%$). Le traitement PMA/iono sur les cellules de tous les chiens, induit une réponse très forte chez les animaux vaccinés et naïfs.

Sur la figure 4.6 sont représentées les réponses T, au traitement (nombre de spot du traitement – nombre de spot des non stimulées) en nombre de spots.

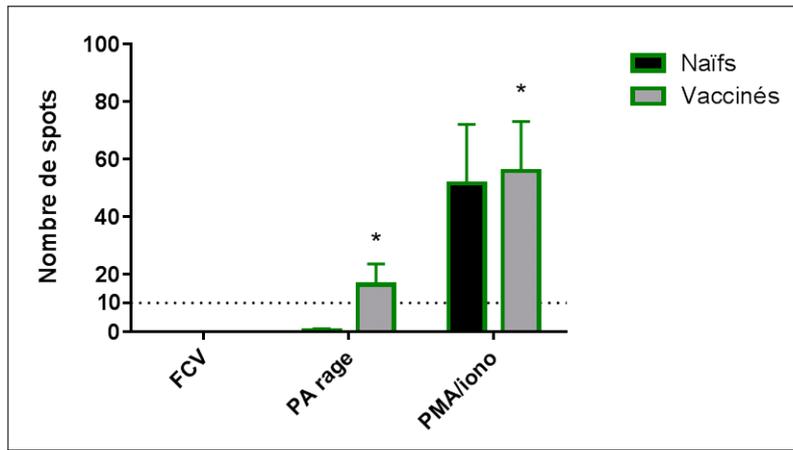


FIGURE 4.6 – Réponse cellulaire Th1, de PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé) en ELISPOT $IFN\gamma$ après stimulation spécifique. Représentation graphique des différences, pour chaque traitement avec la moyenne du nombre de spots sans traitement. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : P -value <0.05 ,(**) : P -value <0.01 . Les barres représentent les medians et les tirets, les troisièmes quartiles.

Après un test de Mann-Whitney entre chiens vaccinés et naïfs, pour le traitement FCV aucune différence n'a été montrée. De même, il n'y a pas de différence entre PBMC de chiens naïfs et vaccinés pour ce qui est du nombre de spots avec une stimulation avec PMA/iono. Par contre une différence significative a été calculée pour ce qui est du traitement avec le PA rage.

L'antigène stimule bien de façon spécifique les cellules des chiens vaccinés contrairement aux chiens naïfs. On peut considérer l'ELISPOT comme méthode de référence. Les cellules donnent de bons résultats à l'état frais. On ne sait pas si après congélation et décongélation elles montreraient les mêmes résultats.

L'antigène de référence peut être utilisé pour stimuler *in vitro* de façon spécifique, les PBMC de chiens vaccinés avec un vaccin inactivé, par voie parentérale. On ne sait pas s'il en est de même pour des PBMC de chiens vaccinés avec un vaccin vivant atténué par la voie parentérale.

Sur ces mêmes cellules fraîches de ce protocole expérimental animal (protocole 1), on réalise en parallèle une stimulation en plaque de culture selon le protocole de stimulation section 3.2.4 page 47.

La réponse en $IFN\gamma$ (figure 4.7), représentée par une soustraction des concentrations en protéines sécrétées dans le surnageant des cellules non stimulées, et celles dont les cellules ont été stimulées, est très différente de la réponse en ELISPOT. En effet, il semble y avoir une augmentation de la sécrétion par les cellules de chiens vaccinés et naïfs avec le

PA rage. Cependant, le contrôle PMA/iono ne montre pas de réponse sur les chiens naïfs, contrairement aux cellules de chiens vaccinés.

Aucune autre cible ne semble montrer un profil « intéressant », excepté IL8 dont la stimulation avec PMA/iono montre une réponse satisfaisante pour les cellules de chiens vaccinés et naïfs. Comme pour $IFN\gamma$ en revanche, même si elle semble faible, une augmentation de la sécrétion semble être montrée avec le PA rage. IL8 est surexprimée avec le PA rage, chez les cellules de chiens vaccinés contre la rage.

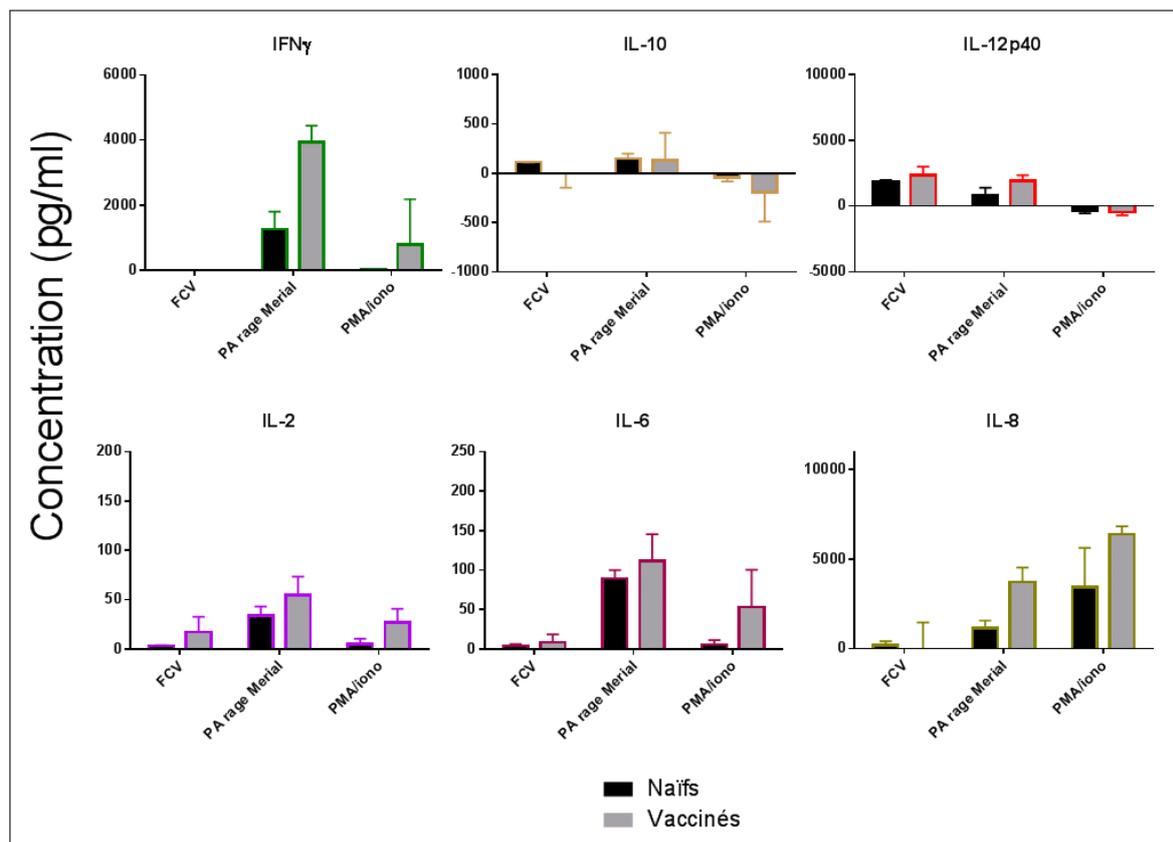


FIGURE 4.7 – Expressions en protéines $IFN\gamma$ et autres cibles, avec la technique Luminex après stimulation spécifique des PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé). Représentation graphique des différences pour chaque traitement avec les concentrations sans traitement. Les barres représentent les medianes et les tirets, les troisièmes quartiles.

IL-8 est une chimiokine sécrétée par les macrophages et autres cellules endothéliales. Je pense qu'il s'agit d'un signal bruit de fond. Il n'y a pas eu de réplicat technique ce qui rend l'interprétation difficile. Cela présage tout de même une grande variabilité de réponse à ce niveau d'expression.

Les résultats obtenus par qPCR (figure 4.8, les expressions des gènes de $IFN\gamma$ et IL-4), nous montrent qu'à 72 h, les PBMC de chiens vaccinés et naïfs, semblent exprimer $IFN\gamma$

après stimulation au PA rage, plus que les cellules non stimulées (différence significative par rapport à un ratio de 1, pour les chiens vaccinés). En revanche PMA/iono semble ne pas surexprimer les gènes de IFN γ dans ces conditions. Pour IL-4 aucun traitement ne montre de surexpression.

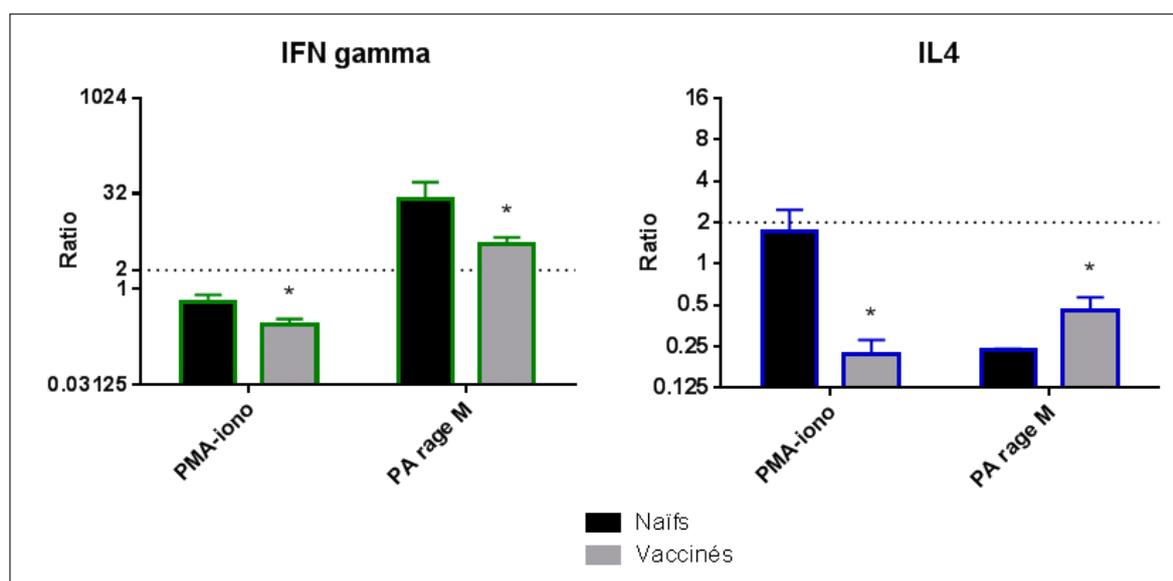


FIGURE 4.8 – Expressions des transcrits de IFN γ et IL-4 en qPCR, après stimulation spécifique des PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé). Représentation graphique des expressions en ratio, pour chaque traitement par rapport aux cellules non traitées. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : *P-value* < 0.05, (**) : *P-value* < 0.01. Les barres représentent les medianes et les tirets, les troisième quartiles en ordonnée est représenté l'expression en ratio.

Il est possible que 72 h ne soit pas un temps d'incubation adéquat, pour observer une réponse spécifique à la rage dans ces conditions.

Expression des ARNm après activation avec l'antigène spécifique En effet, l'expression des transcrits et la sécrétion des cytokines n'étant pas homogène dans le temps [Listvanova et al. \(2003\)](#). Une cinétique d'expression des cytokines, est réalisée pour déterminer le temps idéal et optimiser la méthode (voir section 3.2.4 page 47).

Un titrage de RVNA selon la méthode de titrage FAVN test (section 3.3.1 page 48) a donné des valeurs de 6,01 ; 7,91 et 10,5 UI/mL respectivement pour A, B et C. Ces animaux sont considérés comme vaccinés avec des virus vivants. à J35 A : 281, B : 830 et C : 31.6 UI/mL.

Les titres intermédiaires sont considérés comme très forts : entre 6,01 et 281 UI/mL pour A, 7,91 et 830 UI/mL pour B et entre 10,5 et 31.6 UI/mL pour C.

Après un diagnostic post-mortem, les animaux n'ont pas montré de particule virale, qu'elle soit infectieuse ou pas.

On étudie alors le profil d'expression de IFN γ et IL-4 pour PA rage sur 3 réplicats techniques de 1.10^6 cellules d'un lot provenant de chiens hyperimmunisés avec un vaccin vivant (protocole 2) en réalisant une cinétique à 3 h, 6 h et 48 h. En parallèle on stimule un puits avec des cellules et de la ConA ($2.5 \mu\text{g/mL}$) pendant 6 h et 48 h.

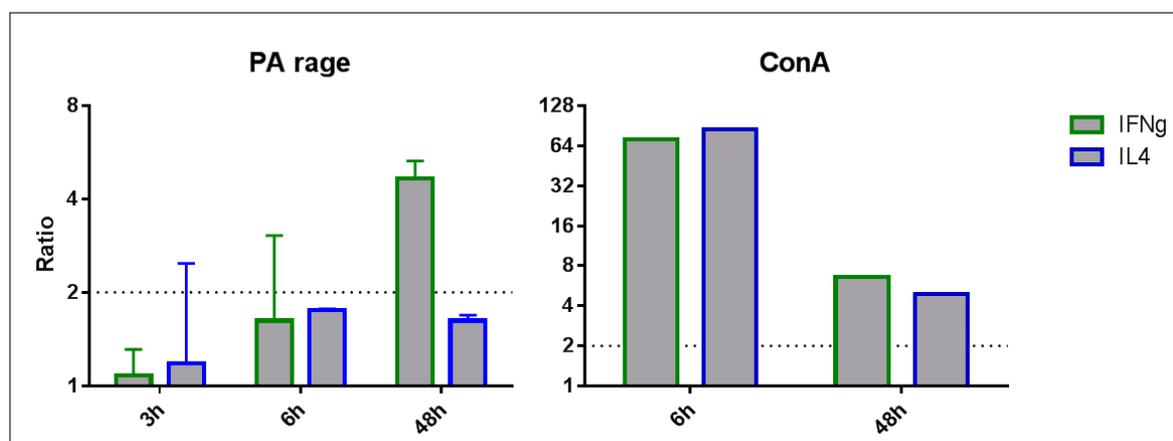


FIGURE 4.9 – Profil d'expression de IFN γ et IL-4 après stimulation avec le PA rage et ConA. Les barres représentent les médianes et les tirets, les troisième quartiles.

Les résultats de la cinétique par qPCR (figure 4.9) montrent qu'il semblerait que 48 h soit un temps d'incubation permettant d'obtenir une expression significative pour IFN γ .

En ce qui concerne IL-4 dans ces conditions, une surexpression n'est pas observée.

Il s'agit d'un essai sur une faible quantité de cellules (en effet, les pertes de cellules à la décongélation, selon les lots de cellules sont parfois importantes). Il eut fallu plus de réplicats biologiques et technique pour conclure avec plus d'assurance. On retient tout de même le temps de 48 h pour privilégier le signal IFN γ .

Par contre on ne peut pas conclure sur la spécificité du signal pour cause d'absence de témoins animaux naïfs.

Le temps choisi pour les stimulations sera de 48h, en effet même si le test n'est pas significatif, il semble se profiler qu'il en soit ainsi. De plus, sur le modèle vulpin de [Lambot et al. \(2001\)](#), les stimulations *in vitro* des PBMCs de renards vaccinés ayant permis de montrer sur certains animaux une surexpression de IFN γ et IL-4, ont été réalisées avec une incubation de 48h.

Dans le cadre de l'utilisation de la qPCR pour mesurer des expressions de gènes, il est important de valider l'utilisation du gène de référence pour l'utiliser dans les calculs.

Il faut dans un premier temps, que les efficacités des qPCR des cibles, soient proches de celle du gène de référence. Une façon de le montrer est de réaliser un ΔCt (cible-gène de référence), sur des dilutions d'un même échantillon en fonction de la concentration en ARN. On valide la condition quand la pente de la régression linéaire est inférieure en valeur absolue à 0.1 (ref: https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative)

Sur la figure 4.10, on voit que les delta ΔCt (IFNg-GAPDH) et (IL4-GAPDH) en fonction de la concentration en ARN montrent des régressions linéaires dont les pentes sont inférieures en valeur absolue, à 0.1.

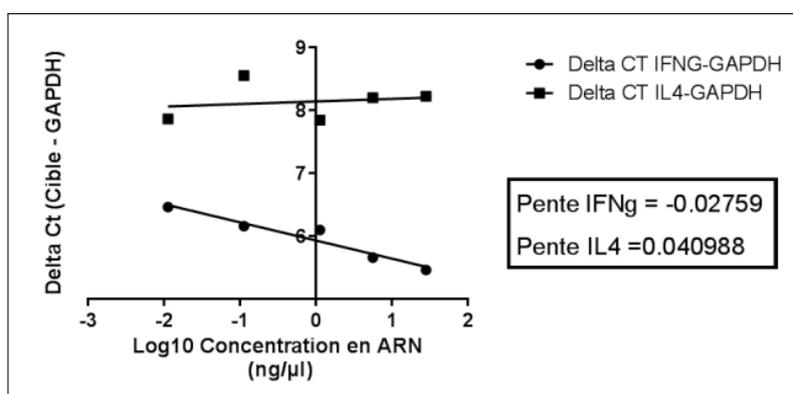


FIGURE 4.10 – Critère de validation de l'utilisation de GAPDH comme gène de référence : efficacité proche, avec les cibles. Représentation graphique des ΔCt (Cible - GAPDH), sur des dilutions croissantes d'un même échantillon, en fonction du log10 de la concentration en ARN. Une pente résultante de la régression linéaire inférieure à 0.1, est un critère de l'utilisation de GAPDH en tant que gène de référence.

Validation du gène de référence De même, il faut que le gène de référence ne soit pas impacté par le traitement (Johnson et al., 2014).

Sur la figure 4.11 sont représentés graphiquement les ΔCt (traitement-NA), en fonction du traitement d'une série de stimulations à 48h, de cellules de chiens vaccinés (protocole 2). On montre que, pour PMA/iono, le traitement impacte l'expression du gène de référence. Ceci peut s'expliquer par une mise en mitose rapide des cellules d'où une diminution des Ct pour les cellules traitées.

Pour FCV, aucune variation n'est montrée. Pour PA rage, une hausse significative est à constater. Par contre celle-ci est très faible (inférieure à 0.5 Ct en moyenne).

Il peut-être remarqué que le choix de transférer un volume fixe d'ARN pour la rétrotranscription (voir section 3.4.4 page 58) et non pas une quantité d'ARN n'a pas été inapproprié. En effet, figure 4.11 on peut observer globalement une dispersion assez faible des valeurs moyennes des Ct de GAPDH de 13 animaux différents.

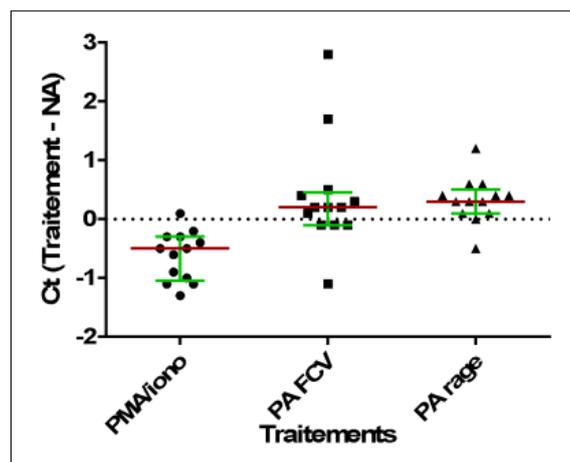


FIGURE 4.11 – Critère de validation de l'utilisation de GAPDH comme gène de référence : Absence de variation des Ct de GAPDH en fonction du traitement.

4.4 Détection de l'immunogenecité cellulaire antirabique par qPCR

A la lumière des résultats obtenus jusque là, il semble possible de mesurer l'expression des cytokines IFN γ après stimulation spécifique de 1.10^6 cellules de chiens vaccinés pendant 48 h, avec la méthode de qPCR optimisée au préalable.

L'application de cette méthode dans le cadre du protocole 1 de vaccination avec un vaccin inactivé (les cellules ayant été congelées), ainsi que les protocoles 2a et 2b permet de connaître la spécificité de la réponse.

Méthode de référence. A l'aide d'un antigène antirabique validé sur cellules de référence avec la méthode de référence ELISPOT IFN γ , on a pu montrer la possible utilisation de la qPCR pour mesurer une expression en IFN γ après stimulation spécifique de 1.10^6 cellules de chien vacciné, après 48 h d'incubation. L'IL-4 ne semble pas montrer une réponse significative dans ces conditions, le nombre faible de réplicats pouvant l'expliquer éventuellement.

Tableau 4.3 – **Résultats bruts d'ELISPOT IFN γ** après stimulation des cellules d'animaux vaccinés ou naïfs, des protocoles de vaccination avec un vaccin inactivé (protocole 1) ou avec un vaccin vivant (protocole 2)

	NA				PA FCV				PA rage			PMA/iono					
	1/V*	2/V	1/N	2/N	1/V	2/V	1/N	2/N	1/V	2/V	1/N	2/N	1/V	2/V	1/N	2/N	
Nombre de spots	16	10	7	2	3	26	10	2	37	24	4	1	194	173	60	72	
	6	3	7	0	9	14	9	9	35	30	4	6	195	290	49	34	
	7	9	10	7	15	14	4	15	53	33	7	12	182	244	21	134	
	11	11	15	2	12	28	3	4	40	33	3	1	160	204	30	44	
	12	1	0	2	8	3	10	5	23	21	1	2	155	126	98	165	
	13	7	2	4	3	4	4	2	42	22	6	3	121	116	61	212	
	5	10	13	8	32	8	4	1	83	34	3	3	115	132	88	136	
	11	9	0	5	33	9	5	1	56	51	12	2	156	68	90	84	
	20	23		30	13	19		2	27	84		1	147	136		127	
	10	21		1	8	22		2	19	78		0	86	186		124	
	13	16		3	7	24		3	29	100		8	142	208		135	
	44	21		18	14	19		0	22	82		3	116	199		78	
	Méd.	12	10	7	4	11	17	5	2	36	34	4	3	151	180	61	126
	Var.	39	22	15	30	30	25	7	15	64	79	11	12	109	222	77	178

(*) a/b : a=protocole a, b=animaux vaccinés (V) ou naïfs (N). (Med.) Médiane. (Var.) Variation, c'est à dire la différence entre le plus grand et le plus petit.

Le tableau 4.3 nous montre que malgré des variations assez importantes, surtout pour les stimulations avec PA rage et PMA/iono avec des variations entre réponse pouvant

aller jusque 222 spots entre le plus faible et le plus fort (protocole 2, chiens vaccinés).

Les médianes des cellules non stimulées des deux protocoles ne dépassent pas les 12 spots avec tout de même des variabilités allant jusque 39 spots, ce qui montre l'importance de réaliser des réplicats techniques dans la recherche d'une conclusion de statut vaccinal sur un individu.

Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés pour comparer les réponses des cellules stimulées et celles des cellules non stimulées.

Sur la figure 4.12, les médianes (barres) et 3^{èmes} quartiles (traits horizontaux) sont représentés pour chaque groupe. Les réponses significativement différentes de NA ont des barres surmontées d'au moins un astérisque ($p < 0,05$), voire 2 asterisques ($p < 0.01$).

Le même profil est observé pour les animaux des deux protocoles à savoir que, pour ce qui est des contrôles, la PMA/iono donne une réponse significative pour les chiens vaccinés comme les chiens naïfs. En ce qui concerne le FCV, aucune réponse n'est observée pour les deux statuts vaccinaux. Avec l'antigène spécifique PA rage, seules les cellules des animaux vaccinés réagissent significativement.

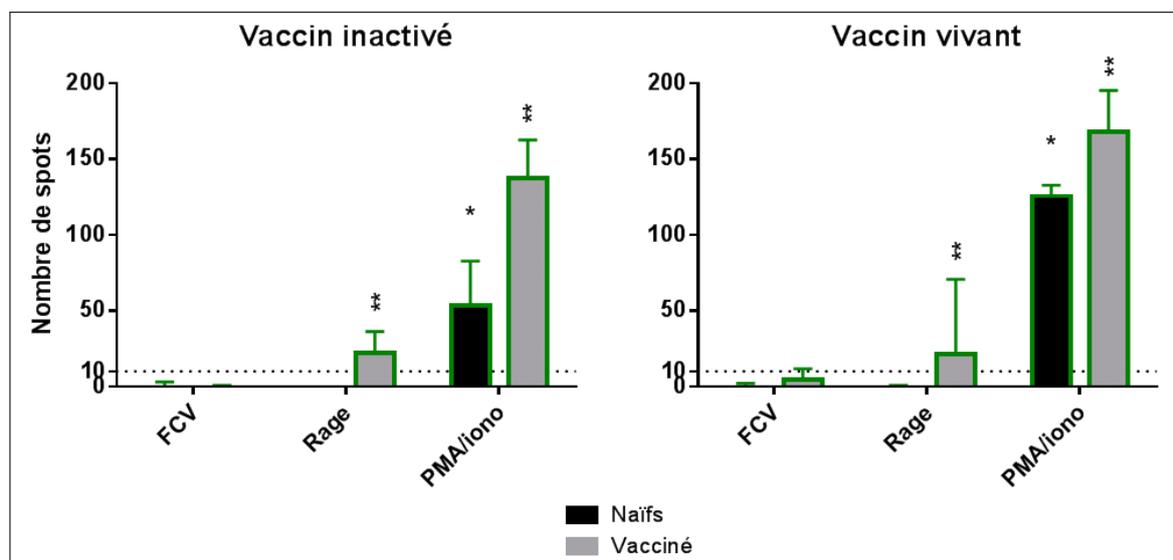


FIGURE 4.12 – Réponse cellulaire Th1, de PBMC des protocoles 1 (vaccin inactivé) et 2 (vaccin vivant) en ELISPOT $IFN\gamma$ après stimulation spécifique. Représentation graphique des différences, pour chaque traitement avec la moyenne du nombre de spots sans traitement. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : P -value < 0.05 , (***) : P -value < 0.01 . Les barres représentent les médianes et les tirets, les troisièmes quartiles.

On peut dire que les cellules des protocoles 2a sont capables dans les mêmes conditions, d'obtenir la même réponse T, spécifique à la vaccination antirabique. Un vaccin vivant est capable d'induire une mémoire T détectable avec l'ELISPOT $IFN\gamma$. Des protéines

IFN γ ont donc été secrétées spécifiquement et il est probable que cette sécrétion ait pu être précédée par une expression plus importante de transcrits de ces gènes.

Expression protéique par ELISA En parallèle de l'essai ELISPOT précédemment décrit, et le jour même, une stimulation a été réalisée à partir des mêmes suspensions cellulaires ainsi qu'avec les mêmes réactifs et principes actifs aux mêmes concentrations finales. 1.10^6 cellules sont stimulées pendant 48h.

Sur les surnageants, IFN γ les concentrations ont été dosées en ELISA.

On voit figure 4.13 une différence de profil entre les deux protocoles.

En ce qui concerne les contrôles FCV, aucun des 2 protocoles, et ce quel que soit le statut des animaux, ne présente une réponse.

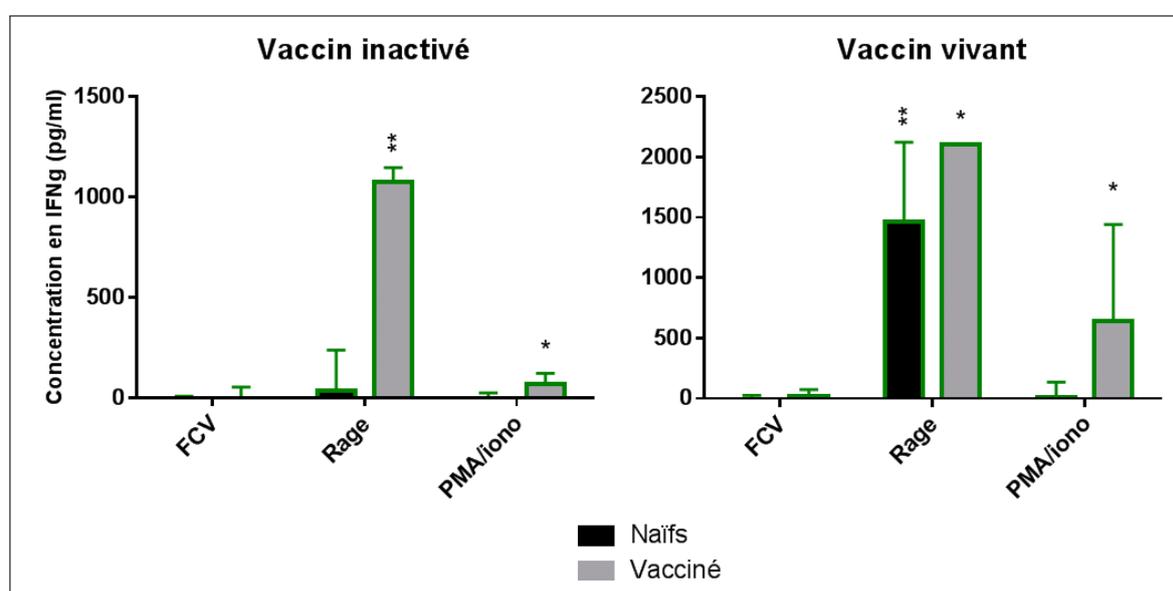


FIGURE 4.13 – **Expression en protéines IFN γ en ELISA après stimulation spécifique.** Représentation graphique des différences pour chaque traitement avec les concentrations sans traitement. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : P -value <0.05 ,(**) : P -value <0.01 . Les barres représentent les médianes et les tirets, les trois quarts.

Contrairement aux résultats de l'ELISPOT, PMA/iono ne provoque qu'une augmentation de la concentration en cytokines secrétées, pour les animaux vaccinés et ce, pour les deux protocoles.

Avec le vaccin inactivé, le PA rage montre une augmentation de la sécrétion de IFN γ significative chez les chiens vaccinés et pas sur les chiens naïfs. Avec les vaccins vivants du protocole 2, les PBMC de tous les animaux quel que soit le statut, montre une aug-

mentation de la sécrétion de $IFN\gamma$ dans le surnageant.

Expression des transcrits par qPCR Les culots de cellules sont eux extraits et rétrotranscrits. On réalise alors une qPCR $IFN\gamma$, IL-4 et GAPDH, en duplicat. Les expressions sont calculées et représentées graphiquement selon leur ratio par rapport aux cellules non stimulées (NA) (ratio de 1).

Un test de Mann-Whitney est effectué pour chaque condition pour tester si le ratio est significativement différent de 1 avec un risque alpha de 0.05 ou 0.01.

En ce qui concerne $IFN\gamma$, pour les deux protocoles (vaccin vivant et inactivé) on constate figure 4.14 le même profil. En ce qui concerne les contrôles dans un premier temps, PMA/iono surexprime très peu les gènes cibles, seule l'expression au niveau des animaux naïfs est significative. Une réponse significative pour le PA FCV (non spécifique) est observée pour les chiens naïfs. Dans un deuxième temps, au niveau de la stimulation spécifique, une surexpression significative avec PA rage pour les animaux naïfs et les animaux vaccinés est observée.

La réponse $IFN\gamma$ par qPCR ne corrèle pas avec la réponse T en ELISPOT.

En ce qui concerne la réponse en IL-4, les profils observés sont différents selon le type de vaccin. En ce qui concerne le vaccin inactivé

En ce qui concerne les contrôles dans un premier temps, PMA/iono surexprime IL-4 chez les animaux vaccinés de manière significative. En ce qui concerne les animaux naïfs, une grande variabilité est observée, ce qui peut s'expliquer par la taille du groupe d'animaux constitué que de 2 individus.

Pour ce qui est de FCV, les ratios pour les animaux des deux statuts vaccinaux, ne sont pas significativement différents de 1.

Ensuite, toujours pour le protocole 1 concernant le vaccin inactivé, les ratios sont faibles (inférieurs à 2), pour les animaux vaccinés et naïfs pour la réponse IL-4 après stimulation spécifique avec le PA rage. Le schéma de réponse ne correspond pas non plus à la réponse attendue.

La réponse à IL-4 pour le protocole concernant les vaccins vivants, montre un profil intéressant. En effet en ce qui concerne les contrôles, PMA/iono surexprime IL-4 de façon importante et significative. PA FCV montre une surexpression qui semble significative même si elle très faible (médiane inférieure à 1). Le PA rage surexprimerait les cellules des animaux vaccinés assez fortement (médiane de ratio à 3.5) et de façon significative. Les cellules de chiens naïfs ne répondent pas en IL-4. Il semblerait qu'on ait là un profil se rapprochant de la réponse T en ELISPOT.

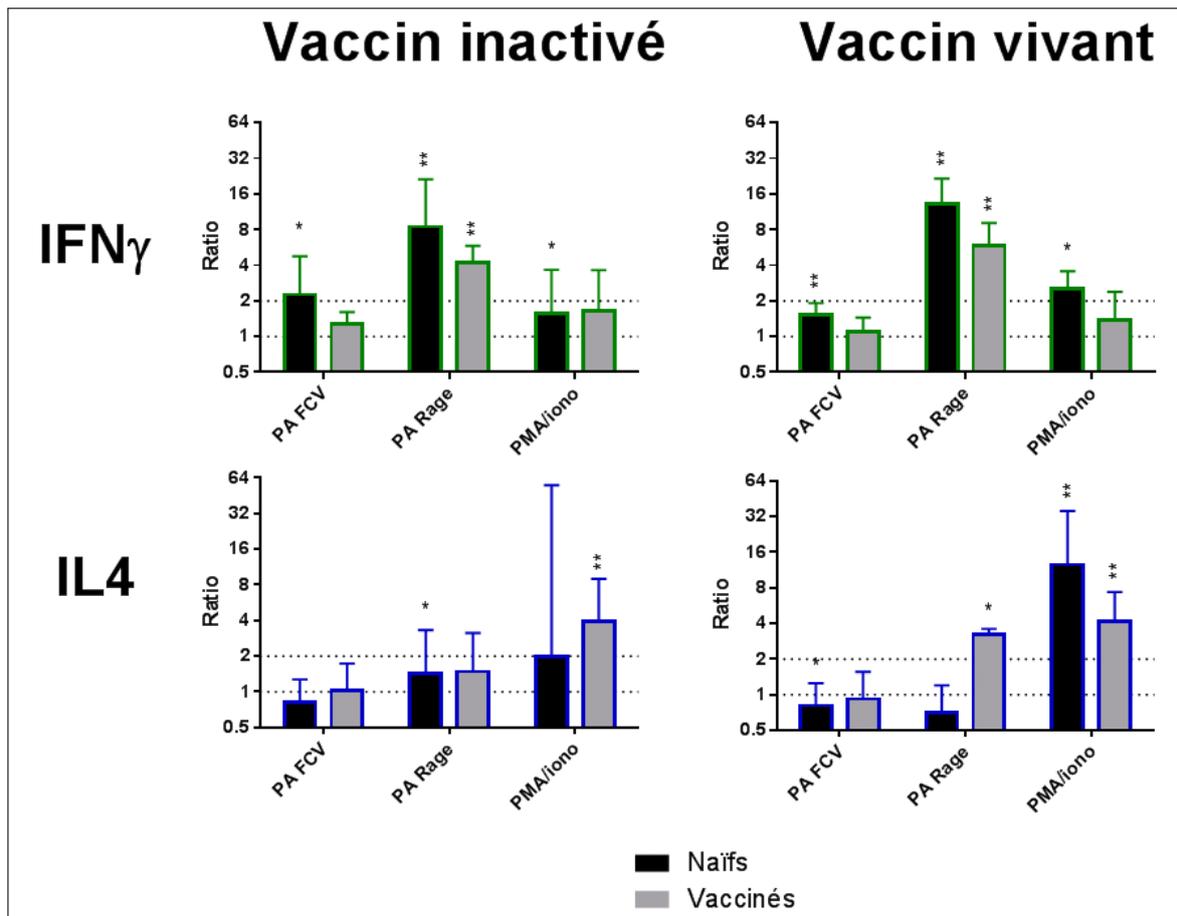


FIGURE 4.14 – Expression de IFN γ et IL-4 après stimulation de PBMC de chiens naïfs ou vaccinés contre la rage avec un vaccin inactivé ou vivant. Représentation graphique des expressions en ratio, pour chaque traitement par rapport aux cellules non traitées. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : *P-value* < 0.05, (**) : *P-value* < 0.01. Les barres représentent les medians et les tirets, les troisièmes quartiles en ordonnée est représenté l'expression en ratio.

En résumé : On est capable de montrer une réponse T spécifique par ELISPOT, sur des PBMC d'animaux vaccinés avec un vaccin inactivé. On a montré que l'ELISPOT pouvait également montrer le statut vacciné avec un vaccin antirabique vivant. Il semblerait qu'une réponse spécifique avec IL-4 par qPCR montre des résultats s'y rapprochant.

A ma connaissance, dans l'équipe R&D immunologie de Boehringer Ingelheim (santé animale), ils n'ont jamais montré chez le chien, de réponse IL-4 (ou très peu) comme en général toutes les cytokines à Th2 (contrairement aux réponses équivalentes chez l'Homme et la souris). La qPCR serait peut-être capable de détecter ce faible signal par contre, pour un vaccin vivant.

En revanche, les animaux du protocole concernant les vaccins inactivés et vivants étaient peu nombreux. De plus, le statut de vaccination des animaux du protocole concer-

nant le vaccin vivant n'a aucune correspondance dans la réalité. Tous ces animaux ont été vaccinés par voie intramusculaire (parentéral).

La dernière partie de la méthodologie annoncée dans le but de répondre à la problématique annoncée, concerne le protocole expérimental 3, sur des chiens du terrain (Maroc), avec des animaux vaccinés par voie intramusculaire, et des animaux vaccinés par voie orale, avec le vaccin vivant SAG2 (voir section 3.1.5).

4.5 Protocole clinique de vaccination orale (application)

Avant vaccination des animaux du protocole 3 (section 3.5 page 37) un titrage par le FAVN test a montré des taux très inférieurs à 0.5 UI/mL.

En ce qui concerne le titrage sur souris de la souche ariana 2 utilisée pour l'euthanasie, le calcul automatique selon Spearman Kärber donne une dose inoculée de $10^{2,9}$ DL50ICS/mL soit 794 DL50ICS. Selon la méthode graphique, $10^{3,1}$ DL50ICS/mL soit 1259 DL50ICS auraient été inoculés.

Dans les 2 cas, il s'agit d'une dose supérieure à celle visée (500 DL50ICS), celle-ci d'autant plus au-delà de la dose habituelle inoculée aux chiens de 200 DL50ICS.

Deux chien naïfs sont morts 32 et 40 jours post-épreuve respectivement. Un diagnostic en FAT et RTCIT a été réalisé sur ces animaux confirmant la mort par la rage. Un séquençage a été réalisé sur les souches correspondantes confirmant la présence d'ariana 2.

Aucun des huit animaux vaccinés n'est mort. Leur euthanasie a été réalisée hors du temps de dernier délais observé. Un diagnostic a été réalisé en FAT confirmant l'absence de particule virale dans le SNC.

Les sérums de tous les animaux ont été titrés en RVNA par la méthode FAVN, sur toute la cinétique du protocole expérimental.

Tableau 4.4 – Résultats des titrages en RVNA par la méthode FAVN test exprimés en UI/mL.

Post-V	VO				VIM				Non vaccinés			
J0	0,22	0,07	0,13	0,1	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J7				0,38	0,04	0,04	4,56	4,56		0,06		
J14	6,01	0,04	0,66				7,92	31,55				
J21				6,01	0,66	1,15	10,45	77,27		0,13	0,04	0,22
J28		0,5	1,51	1,99			10,45	18,55	0,04		0,04	
J35				6,01	1,15	3,46	10,45	18,15		0,04		0,04
J42	1,15	1,87	2,62				13,77		0,04		0,04	
J49				10,45	0,66	0,66	18,15	29,93		0,24		0,24
J60	6,01	2,62	3,46	10,45	0,87	7,92	10,45	31,55	0,04	0,04	0,1	0,04
J90	3,46	1,51	2,62	4,56	0,5	4,56	7,92	31,55	0,04	0,04	0,04	0,04
J168	10,45	1,51	6,01	6,01	0,66	10,45	7,92	13,77	0,04	0,06	0,04	0,04

Les résultats de la figure 4.15 nous permettent d'observer une réponse humorale au vaccin inoculé intramusculairement, avec un pic à J21 et avec chute du taux d'anticorps jusqu'à un plateau très au-dessus (en moyenne 10 UI/mL) de la limite de 0,5 UI/mL.

En ce qui concerne les animaux dont le vaccin a été instillé oralement, un pic de RVNA est observé vers J60, une chute du taux d'anticorps jusqu'à un plateau (en moyenne 7 UI/mL) au dessus de la limite de 0,5 UI/mL. Seul un animal a un taux qui, bien que supérieur à la limite, reste plutôt faible.

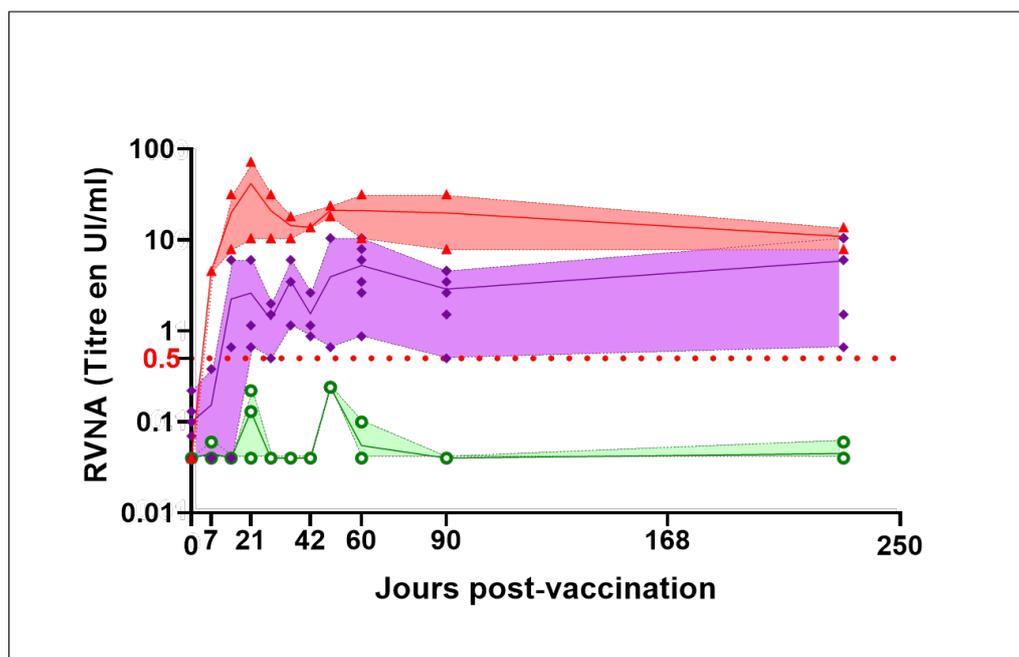


FIGURE 4.15 – **Cinétique du taux d'anticorps neutralisant du protocole clinique 3.** Les lignes représentent la médiane du log 10 du titre en UI/mL de chaque groupe et chaque repère, un animal. En abscisse est représenté le temps en nombre de jour après vaccination (J0). Les aires colorées représentent les étendues des réponses, pour chaque groupe. (—) : les animaux vaccinés intramusculairement, (—) : les animaux vaccinés oralement ; (—) : les animaux du groupe témoin non vaccinés contre la rage. La ligne en pointillé représente la limite de 0.5 UI/mL au dessus de laquelle on considère un individu séropositif.

En ce qui concerne les PBMC correspondantes, elles ont été décongelées et la viabilité mesurée, inférieure à 40 % pour les meilleures.

Une analyse par cytomètre en flux avec un marquage au VIVID a été réalisée sur les échantillons ayant une concentration cellulaire suffisante pour réaliser un test ELISPOT au moins.

Sur la figure 4.16 est représenté à gauche le profil SSC en fonction de FSC (voir section 3.2.1) des cellules, montrant une population de lymphocytes (FSC entre 50k et 100k, SSC entre 0 et 50k) très réduite ne correspondant qu'à moins de 5 % des cellules totales. En

dessous d'un FSC de 20K, s'amassent les débris cellulaires qui sont importants. Sur la partie droite de la figure, on a isolé l'information du marquage au VIVID concernant cette population de lymphocytes. On montre un pourcentage de plus de 12 % de mortalité.

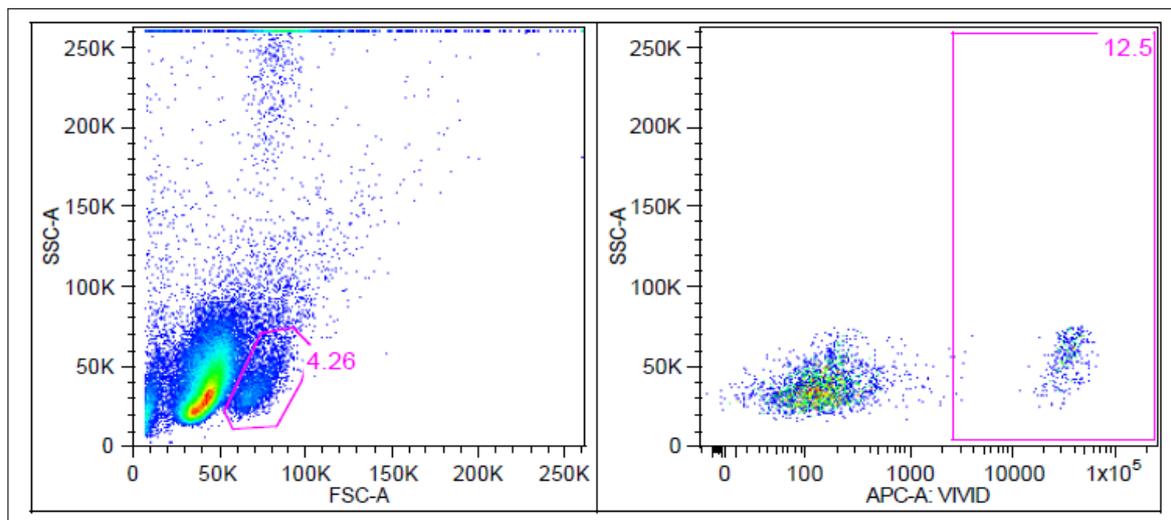


FIGURE 4.16 – Analyse des PBMC du protocole clinique d'efficacité vaccinale. Marquage au vivid et analyse par cytométrie en flux.

Un ELISPOT a été réalisé avec les cellules ayant une viabilité différente de zéro. Aucun spot n'a été révélé quel que soit le traitement (PA rage, PA FCV, PMA/iono).

Les méthodes de prélèvement sanguins, isolement, congélation et décongélation sont très importantes et délicates. De plus, ces cellules ont voyagé durant quelques jours, en carboglace (-78.5°C) alors qu'elles ont été stockées de façon optimales à -195.79°C . Elles ont été manipulées et transférées deux fois dans des containers à azote à leur arrivée au laboratoire. Il se peut qu'elles aient subi un choc de température qui leur ait été fatal.

Des sérums sont envoyés depuis des années au laboratoire pour titrage sans que le transport ne pose problème dans leur analyse. Cela montre la difficulté de travailler sur le pan immunité cellulaire dans le cadre d'études de vaccinations sur le terrain si les échantillons ne sont pas analysés sur place.

Une réflexion sur ce sujet devra être entreprise avant de refaire un essai des méthodes ELISPOT et qPCR IL-4 sur des animaux vaccinés avec un vaccin vivant atténué par voie orale dans des pays éloignés.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

La vaccination orale de masse des chiens avec un vaccin vivant atténué par voie orale pourrait apporter un espoir dans la disparition de la rage humaine, en éliminant le virus des populations de chiens errants dans les pays en développement.

Cette stratégie vaccinale est largement freinée par l'absence d'un indicateur relevant de l'efficacité vaccinale sur le terrain.

En effet, des chiens vaccinés survivent, en conditions expérimentales, à une épreuve virulente malgré l'absence de RVNA lorsque vaccinés oralement avec SAG2® (Cliquet et al., 2007), VRG® (Rupprecht et al., 2005) (Cliquet et al., 2008) et différents vaccins à virus rabique recombinant (Rupprecht et al., 2005).

La mesure du taux de RVNA dans le sang n'est pas fiable chez le chien lors d'une vaccination par voie orale et un autre indicateur de l'immunité est nécessaire.

L'immunité cellulaire est portée par les lymphocytes T mémoires présents dans l'organisme pendant plusieurs années. Ils sont spécifiques de l'antigène qui les a sélectionnés lors d'une première rencontre avec le virus dans l'organisme.

Dans le cadre d'une vaccination contre la rage avec un vaccin antirabique inactivé, inoculé par voie parentérale, on peut les révéler jusque 60 jours après, *in vitro*, en stimulant les PBMC avec un virus inactivé comme antigène de rappel. En effet, les lymphocytes T (clones répondants), sécrètent de l'IFN γ qui est détectable par ELISPOT (Chapat et al., 2017). Il a été montré une réponse à IFN γ et IL-4 par PCR conventionnelle chez le renard, 191 jours après vaccination (Lambot et al., 2001).

L'hypothèse émise est que l'on peut suivre la protection des animaux vaccinés oralement contre la rage avec un vaccin vivant atténué, en stimulant *in vitro* les PBMC avec un virus inactivé et en mesurant une surexpression des transcrits de IFN γ et IL-4.

Durant ce projet j'ai mis en place l'isolement des PBMC ainsi que leur congélation et décongélation qui sont des étapes importantes pour s'assurer de résultats cohérents lors de l'utilisation de ces cellules primaires.

J'ai également mis au point les qPCR spécifiques de IFN γ , IL-4 et du gène de référence GAPDH ainsi que validé les différents critères nécessaires à une analyse argumentée des résultats (efficacités proches de 100 % et identiques pour les cibles et le gène de référence, absence d'effet de la stimulation sur l'expression du gène de référence).

J'ai montré que ces qPCR étaient capables d'observer la surexpression des gènes cibles après une stimulation *in vitro* de PBMC, avec un antigène polyclonal.

Utilisée pour mesurer l'expression des gènes de IFN γ et IL-4 sur des PBMC de chiens vaccinés et stimulés avec un antigène rabique, la méthode a montré dans les conditions expérimentales décrites, que IFN γ était plus surexprimé à 48 h, que 3 h ou 6 h. IL-4 n'a pas montré de surexpression.

Deux protocoles expérimentaux ont généré des PBMC de chiens qui ont été testés avec les qPCR décrites et la méthode de référence (ELISPOT). Les résultats sur les PBMC d'animaux naïfs ont été comparés à ceux d'animaux vaccinés avec un vaccin antirabique inactivé (protocole 1) et d'autres vaccinés (hyperimmunisés) avec l'équivalent d'un vaccin vivant (protocole 2). La méthode de référence a validé les conditions expérimentales en montrant un profil de réponse T spécifique à $\text{IFN}\gamma$ avec l'antigène de rappel pour les animaux vaccinés, et une absence de réponse pour les animaux naïfs et ce, pour les deux protocoles (figure 4.12). La réponse concernant les transcrits n'a pas donné un profil adéquat pour l'expression de $\text{IFN}\gamma$, celui-ci ayant le même profil exactement pour les deux protocoles. Le profil pour IL-4 pour le protocole 1 (vaccin inactivé) n'a pas donné de réponse spécifique. Par contre en ce qui concerne les animaux vaccinés avec les vaccins vivants, le profil d'expression d'IL-4 semble montrer une réponse spécifique.

Dans le but de répondre à la problématique qui nous intéresse, j'ai mis en place un protocole clinique (protocole 3) sur des chiens au Maroc pour réaliser une étude d'efficacité vaccinale avec un vaccin oral vivant atténué. Le but était de montrer s'il y a corrélation entre les signaux de l'immunité cellulaire, la sérologie et la protection effective du vaccin (après épreuve). J'ai transmis la technique d'isolement et de congélation de PBMC à nos collègues de l'ONSSA (Maroc) à distance. Ils ont de plus, réalisé des prélèvements sanguins avec extraction du sérum. Ces derniers ont été titrés en RVNA par notre équipe «sérologie».

Les PBMC issues de ce dernier protocole, ont été décongelées dans le but de tester les méthodes de qPCR et ELISPOT dans ces conditions. Aucune des cellules du protocole, n'a eu les qualités suffisantes pour être stimulé de façon satisfaisante (viabilité <40%, ELISPOT ne montrant aucun spot quel que soit le traitement).

Le dernier protocole n'ayant pas pu être exploité, on ne peut pas répondre à la problématique.

Il serait vraiment intéressant de confronter la qPCR IL4 et l'ELISPOT $\text{IFN}\gamma$ avec une vaccination orale avec un vaccin vivant, comme il était prévu dans ce projet.

Des projets dans ce sens sont d'ores et déjà en cours de préparation avec une volonté d'inclure le pan immunité cellulaire et je serai amenée à y participer grâce aux travaux effectués durant la préparation au diplôme de l'EPHE.

Cela nécessiterait toutefois, à la lumière de notre expérience acquise lors de ce projet, quelques aménagements techniques pour adapter le protocole aux réalités du terrain (manque de moyens, de matériel, stockage incertain, formation sur place du personnel. . .). En effet il y a une énorme différence, entre un échantillonnage de sérum sur le terrain, et celui de PBMC. La maîtrise des techniques d'isolement et de congélation est essentielle.

Malgré tout, on a montré que , des PBMC stockées plusieurs années dans des conditions stables, étaient capables d'exprimer les spécificités de la mémoire immunitaire antirabique.

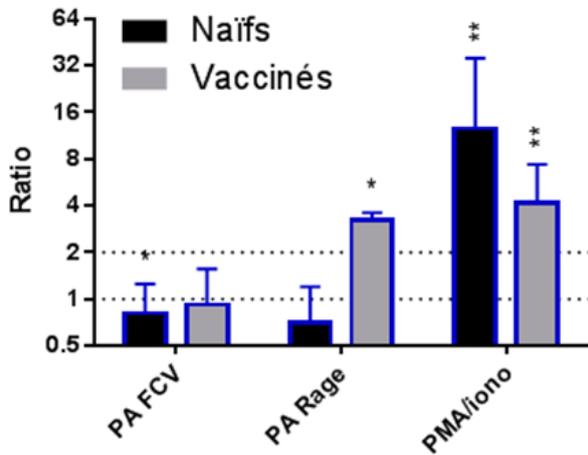


FIGURE 5.1 – Réponse en IL4 sur les PBMC de chiens vaccinés avec un vaccin vivant. Profil d'expression de transcrits, spécifique

On a vu que l'ELISPOT pouvait montrer une réponse T spécifique avec un vaccin vivant, inoculé par voie intramusculaire. Cette technique, de par sa simplicité de mise en œuvre et sa robustesse (mêmes résultats avec un vaccin inactivé et vivant avec cellules fraîches et congelées ...) est un bon candidat pour étudier l'instillation du vaccin par voie orale.

On a montré que gslil4 avait le même profil de réponse avec le vaccin vivant, que l'ELISPOT.

J'ai réalisé des calculs de coût pour comparer l'utilisation de la qPCR et l'ELISPOT (figure 5.2), si une campagne de vaccination de masse (voir figure 5.2) devait être programmée. Il apparaît que, en ciblant un gène ou deux, en qPCR simplexe ou multiplexe, le coût de la qPCR est toujours plus élevé qu'un ELISPOT.

de vaccination de masse (voir figure 5.2) devait être programmée. Il apparaît que, en ciblant un gène ou deux, en qPCR simplexe ou multiplexe, le coût de la qPCR est toujours plus élevé qu'un ELISPOT.

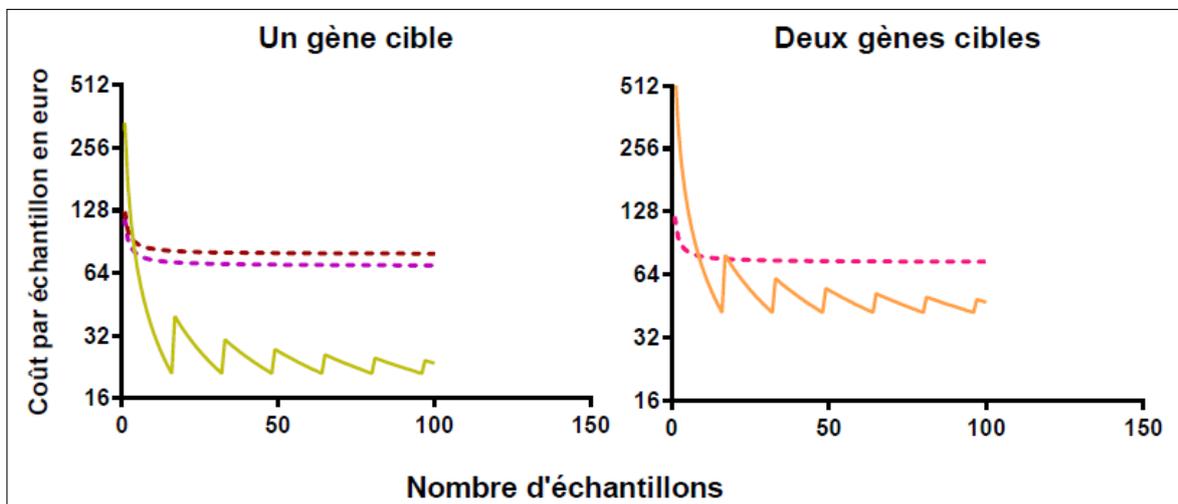


FIGURE 5.2 – Analyse coûts méthodes ELISPOT qPCR duplicat de stimulation, NA, PA rage et contrôle pos polyclonal

Avant d'utiliser une de ces techniques en "routine", elles doivent, et c'est ce pourquoi

on les étudie, montrer une réponse spécifique là où la sérologie est négative. Il faudra beaucoup d'animaux et de protocoles cliniques d'efficacité vaccinale, pour confronter les résultats des mesures de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire.

D'autres techniques plus spécifiques, pourraient être éventuellement réfléchies comme les polymères de CMH. Cette méthode permet de mesurer la réponse LTh à un vaccin de façon très spécifique.

Bibliographie

(1992). WHO Expert committee on rabies - 8th report. Expert Committee on Rabies 8, World Health Organisation (WHO), Geneva.

(2017). Zero by 30 : The Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-transmitted Rabies by 2030. World Rabies Day. Technical report, Geneva.

Amarasinghe, G. K., Aréchiga Ceballos, N. G., Banyard, A. C., Basler, C. F., Bavari, S., Bennett, A. J., Blasdell, K. R., Briese, T., Bukreyev, A., Cai, Y., Calisher, C. H., Campos Lawson, C., Chandran, K., Chapman, C. A., Chiu, C. Y., Choi, K.-S., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolja, V. V., Dolnik, O., Domier, L. L., Dürrwald, R., Dye, J. M., Easton, A. J., Ebihara, H., Echevarría, J. E., Fooks, A. R., Formenty, P. B. H., Fouchier, R. A. M., Freuling, C. M., Ghedin, E., Goldberg, T. L., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Jiāng, D., Kityo, R., Kobinger, G. P., Kondō, H., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kurath, G., Lamb, R. A., Lee, B., Leroy, E. M., Maes, P., Maisner, A., Marston, D. A., Mor, S. K., Müller, T., Mühlberger, E., Ramírez, V. M. N., Netesov, S. V., Ng, T. F. F., Nowotny, N., Palacios, G., Patterson, J. L., Pawęska, J. T., Payne, S. L., Prieto, K., Rima, B. K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmle, M., Siddell, S., Smither, S. J., Song, Q., Song, T., Stenglein, M. D., Stone, D. M., Takada, A., Tesh, R. B., Thomazelli, L. M., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J. S., Vasilakis, N., Vázquez-Morón, S., Verdugo, C., Volchkov, V. E., Wahl, V., Walker, P. J., Wang, D., Wang, L.-F., Wellehan, J. F. X., Wiley, M. R., Whitfield, A. E., Wolf, Y. I., Yè, G., Zhāng, Y.-Z., and Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the order Mononegavirales : Update 2018. *Archives of Virology*.

Appolinário, C. M., Allendorf, S. D., Peres, M. G., Ribeiro, B. D., Fonseca, C. R., Vicente, A. F., Antunes, J. a. M. A. d. P., and Megid, J. (2016). Profile of Cytokines and Chemokines Triggered by Wild-Type Strains of Rabies Virus in Mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2) :378–383.

Baer, G. M., Shanthaveerappa, T. R., and Bourne, G. H. (1965). Studies on the pa-

- thogenesis of fixed rabies virus in rats. *Bulletin of the World Health Organization*, 33(6) :783–794.
- Bailey, D. M., Roukens, R., Knauth, M., Kallenberg, K., Christ, S., Mohr, A., Genius, J., Storch-Hagenlocher, B., Meisel, F., McEneny, J., Young, I. S., Steiner, T., Hess, K., and Baärtsch, P. (2006). Free Radical-Mediated Damage to Barrier Function is not Associated with Altered Brain Morphology in High-Altitude Headache. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(1) :99–111.
- Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., and Lafay, F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *Journal of Virology*, 65(8) :4198–4203.
- Berthelot, L. and Laplaud, D. (2008). Organisation de la réponse immunitaire dans le système nerveux central. *La lettre du neurologue*, XII(8) :236–242.
- BIO-RAD (16). A guide to gating in flow cytometry.
- Blanton, J. D., Self, J., Niezgoda, M., Faber, M.-L., Dietzschold, B., and Rupprecht, C. (2007). Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. *Vaccine*, 25(42) :7296–7300.
- Bonilla, F. A. and Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2) :S33–S40.
- Chamizo, C., Rubio, J. M., Moreno, J., and Alvar, J. (2001). Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by [correction of zby] a single tube RT-PCR. *Veterinary immunology and immunopathology*, 83(3-4) :191–202.
- Chapat, L., Hilaire, F., Bouvet, J., Pialot, D., Philippe-Reversat, C., Guiot, A.-L., Remolue, L., Lechenet, J., Andreoni, C., Poulet, H., Day, M. J., De Luca, K., Cariou, C., and Cupillard, L. (2017). Multivariate analysis of the immune response to a vaccine as an alternative to the repetition of animal challenge studies for vaccines with demonstrated efficacy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 189 :58–65.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2) :S3–23.
- Cliquet, F., Aubert, M., and Sagné, L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of immunological methods*, 212(1) :79–87.

- Cliquet, F., Barrat, J., Guiot, A. L., Caël, N., Boutrand, S., Maki, J., and Schumacher, C. L. (2008). Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies glycoprotein vaccine in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). *Vaccine*, 26(36) :4627–4638.
- Cliquet, F., Guiot, A.-L., Aubert, M., Robardet, E., Rupprecht, C. E., and Meslin, F.-X. (2018). Oral vaccination of dogs : A well-studied and undervalued tool for achieving human and dog rabies elimination. *Veterinary Research*, 49(1) :61.
- Cliquet, F., Gurbuxani, J., Pradhan, H., Pattnaik, B., Patil, S., Regnault, A., Begouen, H., Guiot, A., Sood, R., Mahl, P., Singh, R., Meslin, F., Picard, E., Aubert, M., and Barrat, J. (2007). The safety and efficacy of the oral rabies vaccine SAG2 in Indian stray dogs. *Vaccine*, 25(17) :3409–3418.
- Cliquet, F., Robardet, E., and Picard Meyer, E. (2013). Genetic strain modification of a live rabies virus vaccine widely used in Europe for wildlife oral vaccination. *Antiviral Research*, 100(1) :84–89.
- Costantini, A., Mancini, S., Giuliodoro, S., Butini, L., Regnery, C. M., Silvestri, G., and Montroni, M. (2003). Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *Journal of Immunological Methods*, 278(1-2) :145–155.
- Dietzschold, B., Li, J., Faber, M., and Schnell, M. (2008). Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virology*, 3(5) :481–490.
- Disis, M. L., dela Rosa, C., Goodell, V., Kuan, L.-Y., Chang, J. C., Kuus-Reichel, K., Clay, T. M., Kim Lyerly, H., Bhatia, S., Ghanekar, S. A., Maino, V. C., and Maecker, H. T. (2006). Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *Journal of Immunological Methods*, 308(1-2) :13–18.
- Gerber, J., Sharpee, R., Swieczkowski, T., and Beckenhauer, W. (1985). Cell-mediated immune response to rabies virus in dogs following vaccination and challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 9(1) :13–22.
- Gnanadurai, C. W., Zhou, M., He, W., Leyson, C. M., Huang, C.-T., Salyards, G., Harvey, S. B., Chen, Z., He, B., Yang, Y., Hooper, D. C., Dietzchold, B., and Fu, Z. F. (2013). Presence of virus neutralizing antibodies in cerebral spinal fluid correlates with non-lethal rabies in dogs. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9) :e2375.
- Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., Barrat, J., Blanton, J. D., Briggs, D. J., Cleaveland, S., Costa, P., Freuling, C. M., Hiby, E.,

- Knopf, L., Leanes, F., Meslin, F.-X., Metlin, A., Miranda, M. E., Müller, T., Nel, L. H., Recuenco, S., Rupprecht, C. E., Schumacher, C., Taylor, L., Vigilato, M. A. N., Zinsstag, J., Dushoff, J., and Prevention, o. b. o. t. G. A. f. R. C. P. f. R. (2015). Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(4) :e0003709.
- Hanham, C. A., Zhao, F., and Tignor, G. H. (1993). Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *Journal of Virology*, 67(1) :530–542.
- Hartley, A. N., Cooley, G., Gwyn, S., Orozco, M. M., and Tarleton, R. L. (2014). Frequency of IFN γ -producing T cells correlates with seroreactivity and activated T cells during canine *Trypanosoma cruzi* infection. *Veterinary Research*, 45 :6.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, 10(4) :413–417.
- Horowitz, A., Behrens, R. H., Okell, L., Fooks, A. R., and Riley, E. M. (2010). NK cells as effectors of acquired immune responses : Effector CD4+ T cell-dependent activation of NK cells following vaccination. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(5) :2808–2818.
- Houff, S. A., Burton, R. C., Wilson, R. W., Henson, T. E., London, W. T., Baer, G. M., Anderson, L. J., Winkler, W. G., Madden, D. L., and Sever, J. L. (1979). Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. *The New England Journal of Medicine*, 300(11) :603–604.
- Im Hof, M., Williamson, L., Summerfield, A., Balmer, V., Dutoit, V., Kandimalla, E. R., Yu, D., Zurbriggen, A., Doherr, M. G., Peel, J., and Roosje, P. J. (2008). Effect of synthetic agonists of toll-like receptor 9 on canine lymphocyte proliferation and cytokine production in vitro. *Veterinary immunology and immunopathology*, 124(1-2) :120–131.
- Johnson, C. M., Yang, S., Sellins, K. S., and Frank, G. R. (2004). Selection of HPRT primers as controls for determination of mRNA expression in dogs by RT-PCR. *Veterinary immunology and immunopathology*, 99(1-2) :47–51.
- Johnson, G., Nour, A. A., Nolan, T., Huggett, J., and Bustin, S. (2014). Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1160 :5–17.

- Johnson, R. T. (1965). Experimental rabies. Studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 24(4) :662–674.
- Kammouni, W., Wood, H., Saleh, A., Appolinario, C. M., Fernyhough, P., and Jackson, A. C. (2015). Rabies virus phosphoprotein interacts with mitochondrial Complex I and induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Journal of Neurovirology*, 21(4) :370–382.
- Katz, I. S. S., Guedes, F., Fernandes, E. R., and dos Ramos Silva, S. (2017). Immunological aspects of rabies : A literature review. *Archives of Virology*, 162(11) :3251–3268.
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10) :1289–1291.
- Kreher, C. R., Dittrich, M. T., Guerkov, R., Boehm, B. O., and Tary-Lehmann, M. (2003). CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods*, 278(1-2) :79–93.
- Krummel, M. F., Bartumeus, F., and Gérard, A. (2016). T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 16(3) :193–201.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögren, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., and Zoric, N. (2006 Apr-Jun). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3) :95–125.
- Lafay, F., Bénéjean, J., Tuffereau, C., Flamand, A., and Coulon, P. (1994). Vaccination against rabies : Construction and characterization of SAG2, a double avirulent derivative of SADBern. *Vaccine*, 12(4) :317–320.
- Lafon, M. (2005a). Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 289 :239–258.
- Lafon, M. (2005b). Rabies virus receptors. *Journal of Neurovirology*, 11(1) :82–87.
- Lafon, M. (2011). Evasive strategies in rabies virus infection. *Advances in Virus Research*, 79 :33–53.
- Lambot, M., Blasco, E., Barrat, J., Cliquet, F., Brochier, B., Renders, C., Krafft, N., Bailly, J., Munier, M., Aubert, M. F., and Pastoret, P. P. (2001). Humoral and cell-mediated immune responses of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and

- secondary oral vaccination using SAG2 and V-RG vaccines. *Vaccine*, 19(13-14) :1827–1835.
- Lau, P. and Joly, E. (2001). Le contexte immunologique très particulier du système nerveux central. *médecine/sciences*, 17(3) :395–401.
- Lenarczyk, A., Helsloot, J., Farmer, K., Peters, L., Sturgess, A., and Kirkham, B. (2000). Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls. *Clinical and Experimental Immunology*, 122(1) :41–48.
- Listvanova, S., Temmerman, S., Stordeur, P., Verscheure, V., Place, S., Zhou, L., Loch, C., and Mascart, F. (2003). Optimal kinetics for quantification of antigen-induced cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by real-time PCR and by ELISA. *Journal of immunological methods*, 281(1-2) :27–35.
- Liu, J., Wang, H., Gu, J., Deng, T., Yuan, Z., Hu, B., Xu, Y., Yan, Y., Zan, J., Liao, M., DiCaprio, E., Li, J., Su, S., and Zhou, J. (2017). BECN1-dependent CASP2 incomplete autophagy induction by binding to rabies virus phosphoprotein. *Autophagy*, 13(4) :739–753.
- Lycke, E. and Tsiang, H. (1987). Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *Journal of Virology*, 61(9) :2733–2741.
- Masson, E., Bruyère-Masson, V., Vuillaume, P., Lemoyne, S., and Aubert, M. (1999). Rabies oral vaccination of foxes during the summer with the VRG vaccine bait. *Veterinary Research*, 30(6) :595–605.
- Miao, F.-M., Zhang, S.-F., Wang, S.-C., Liu, Y., Zhang, F., and Hu, R.-L. (2017). Comparison of immune responses to attenuated rabies virus and street virus in mouse brain. *Archives of Virology*, 162(1) :247–257.
- Minke, J., Bouvet, J., Cliquet, F., Wasniewski, M., Guiot, A., Lemaitre, L., Cariou, C., Cozette, V., Vergne, L., and Guigal, P. (2009). Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Veterinary Microbiology*, 133(3) :283–286.
- Nakamichi, K., Inoue, S., Takasaki, T., Morimoto, K., and Kurane, I. (2004). Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Journal of Virology*, 78(17) :9376–9388.

- Nazé, F., Suin, V., Lamoral, S., Francart, A., Brochier, B., Roels, S., Mast, J., Kalai, M., and Van Gucht, S. (2013). Infectivity of rabies virus-exposed macrophages. *Microbes and Infection*, 15(2) :115–125.
- Palacios, R. (1982). Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 128(1) :337–342.
- Perrin, P., Jacob, Y., Aguilar-Sétien, A., Loza-Rubio, E., Jallet, C., Desmézières, E., Aubert, M., Cliquet, F., and Tordo, N. (1999). Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine*, 18(5-6) :479–486.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9) :e45.
- Picard-Meyer, E., Beven, V., Hirchaud, E., Guillaume, C., Larcher, G., Robardet, E., Servat, A., Blanchard, Y., and Cliquet, F. (2018). Lleida Bat Lyssavirus isolation in *Miniopterus schreibersii* in France : XXXX. *Zoonoses and Public Health*.
- Ramachandran, H., Laux, J., Moldovan, I., Caspell, R., Lehmann, P. V., and Subbramanian, R. A. (2012). Optimal thawing of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for use in high-throughput human immune monitoring studies. *Cells*, 1(3) :313–324.
- Riedhammer, C., Halbritter, D., and Weissert, R. (2014). Peripheral Blood Mononuclear Cells : Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. In Weissert, R., editor, *Multiple Sclerosis*, volume 1304, pages 53–61. Springer New York, New York, NY.
- Rodrigues, C. A. T., Batista, L. F. d. S., Filho, R. S. T., Santos, C. d. S., Pinheiro, C. G., de Almeida, T. F., de Freitas, L. A. R., and Veras, P. S. T. (2009). IFN-gamma expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. *Veterinary immunology and immunopathology*, 127(3-4) :382–388.
- Roy, A. and Hooper, D. C. (2007). Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier. *J. Virol.*, 81 :7993–7998.
- Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., Blanton, J., Manangan, J., Morrill, P., Murphy, S., Niezgodá, M., Orciari, L. A., Schumacher, C. L., and Dietzschold, B. (2005). Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. *Virus research*, 111(1) :101–105.

- Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., and Hemachudha, T. (2002). Rabies re-examined. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2(6) :327–343.
- Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., and Melby, P. C. (2006). Quantification of canine cytokines using real time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 26 Suppl 1 :254–263.
- Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C., and Papaneri, A. (2010). The cell biology of rabies virus : Using stealth to reach the brain. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(1) :51–61.
- Shim, E., Hampson, K., Cleaveland, S., and Galvani, A. P. (2009). Evaluating the cost-effectiveness of rabies post-exposure prophylaxis : A case study in Tanzania. *Vaccine*, 27(51) :7167–7172.
- Silva, D., Ponte, C. G., Hacker, M. A., and Antas, P. R. (2013). A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Acta Tropica*, 127(2) :75–81.
- Suzuki, T., Higgins, P. J., and Crawford, D. R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29(2) :332–337.
- Thoulouze, M. I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., and Lafon, M. (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of Virology*, 72(9) :7181–7190.
- Tollis, M., Dietzschold, B., Volia, C. B., and Koprowski, H. (1991). Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine*, 9(2) :134–136.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15) :e115–e115.
- Voigt, D., Tinline, R., and Broekhoven, L. (1985). A spatial simulation model for rabies control. In *Population Dynamics of Rabies Wildlife*, pages pp 311–349. Bacon J., London, academic press edition.
- Vuailat, C., Varrin-Doyer, M., Bernard, A., Sagardoy, I., Cavagna, S., Chounlamountri, I., Lafon, M., and Giraudon, P. (2008). High CRMP2 expression in peripheral T lymphocytes is associated with recruitment to the brain during virus-induced neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 193(1-2) :38–51.

- Wandeler, A. I., Capt, S., Kappeler, A., and Hauser, R. (1988). Oral immunization of wildlife against rabies : Concept and first field experiments. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 Suppl 4 :S649–653.
- Wang, S.-Y., Hsu, M.-L., Tzeng, C.-H., Hsu, H.-C., and Ho, C.-K. (1998). The Influence of Cryopreservation on Cytokine Production by Human T Lymphocytes. *Cryobiology*, 37(1) :22–29.
- Weinberg, A., Song, L.-Y., Wilkening, C., Sevin, A., Blais, B., Louzao, R., Stein, D., Defechereux, P., Durand, D., Riedel, E., Raftery, N., Jesser, R., Brown, B., Keller, M. F., Dickover, R., McFarland, E., Fenton, T., and for the Pediatric ACTG Cryopreservation Working Group (2009). Optimization and Limitations of Use of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Functional and Phenotypic T-Cell Characterization. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(8) :1176–1186.
- WHO Expert Consultation on Rabies and Weltgesundheitsorganisation, editors (2018). *WHO Expert Consultation on Rabies : Third Report, Bangkok, Thailand on 26-28 April 2017*. Number 1012 in WHO Technical Report Series. WHO, Geneva.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22(1) :130–131, 134–138.
- Wunner, W. H., Larson, J. K., Dietzschold, B., and Smith, C. L. (1988). The molecular biology of rabies viruses. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 Suppl 4 :S771–784.
- Yang, Y., Huang, Y., Gnanadurai, C. W., Cao, S., Liu, X., Cui, M., and Fu, Z. F. (2015). The inability of wild-type rabies virus to activate dendritic cells is dependent on the glycoprotein and correlates with its low level of the de novo-synthesized leader RNA. *Journal of Virology*, 89(4) :2157–2169.

ANNEXES

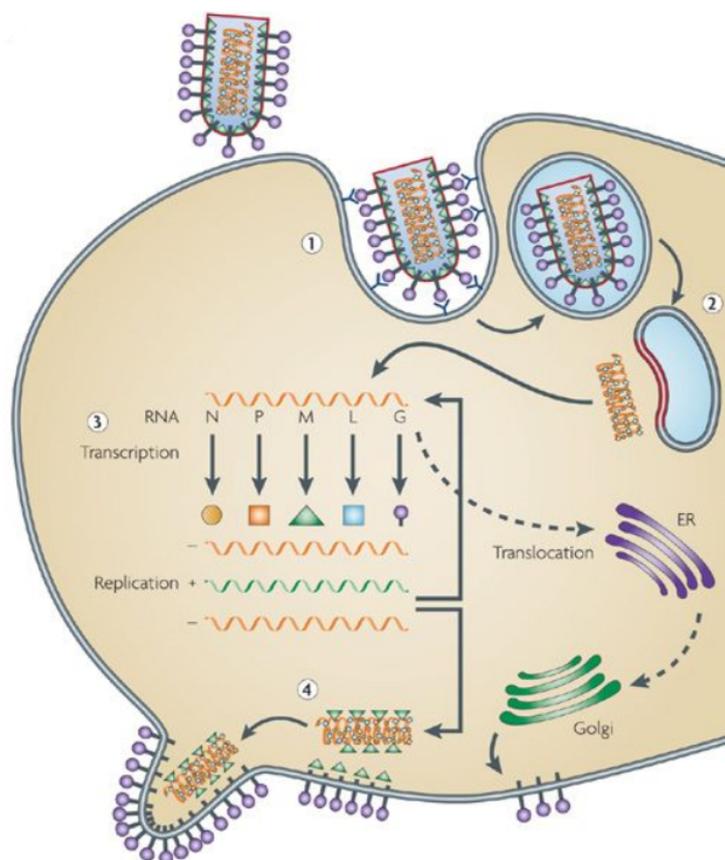


FIGURE 3 – **Cycle de répllication du virus de la rage.** Le Cycle de répllication simplifié du virus de la rage dans une cellule infectée peut être divisé en trois phases différentes ; **1** : La première phase inclut l'accroche et l'entrée dans la cellule hôte par endocytose ; **2** : suivi de la fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire pour libérer le génome viral ; **3** : Dans la deuxième phase, les composants du virion sont synthétisés par transcription, répllication et synthèse de protéine ; **4** : La dernière phase du cycle est l'assemblage des composants viraux, le bourgeonnement et la sortie des virions du virus rabique . Ainsi peut commencer un nouveau cycle (Schnell et al., 2010).

Tableau 1 – **Composition du tampon de traitement éliminant les traces d'hématies lors de l'isolement de PBMC.** Le tampon est stabilisé à pH 7 et filtré à 0,22 μm .

Tampon de traitement	
Nom du produit	Quantité nécessaire
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	8,29 g
Potassium HydrogénéCarbonate (KHCO_3)	1 g
Na_2EDTA	37,2 mg
Eau distillée	800 mL

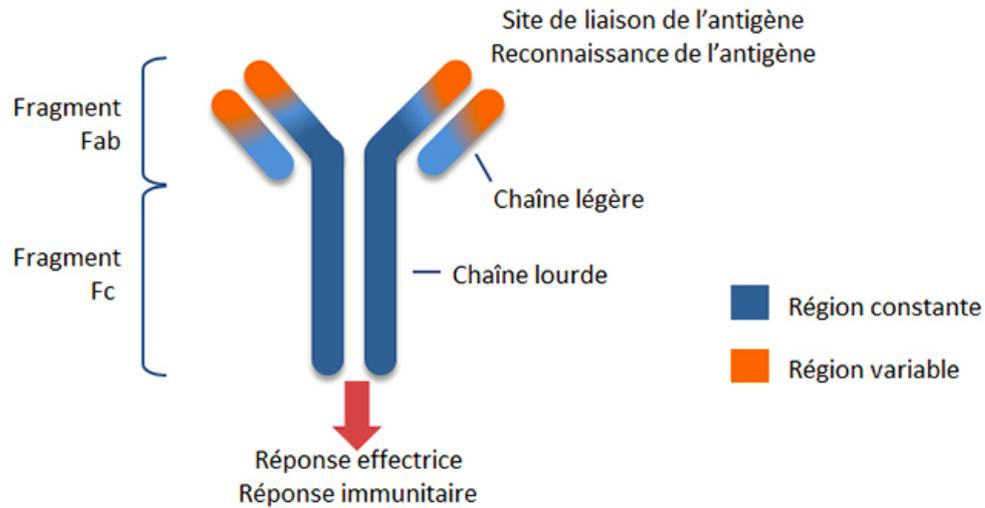


FIGURE 4 – **Schéma d'un anticorps.** Cette immunoglobuline est composée de deux chaînes protéiques dites lourdes et deux chaînes légères. Une des deux extrémités des quatre chaînes forment le fragment Fab, dont la configuration très spécifique reconnaît un antigène particulier. L'autre extrémité des chaînes lourdes correspond au fragment Fc qui n'est pas variable et est reconnu par des récepteurs spécialisés de certaines cellules de l'immunité. La reconnaissance des récepteurs aux fragments Fc peut déclencher une internalisation par la cellule par exemple, d'un antigène neutralisé par une multitude d'anticorps neutralisants. Elle explique en partie la rapidité de la réponse immunitaire secondaire.



FIGURE 5 – **Boîtes de cryogénération de cellules.** A : CoolCell® (biocision™) ; B : Mr. Frosty® (Nalgene™).

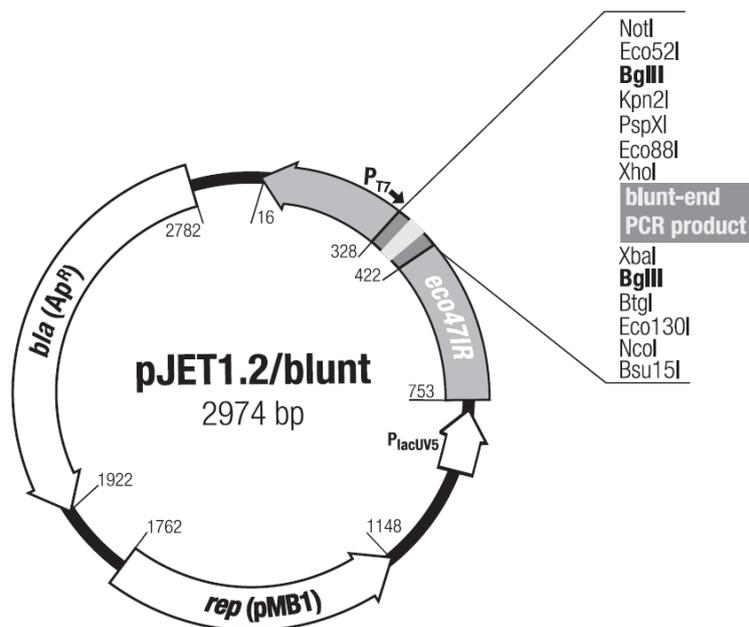
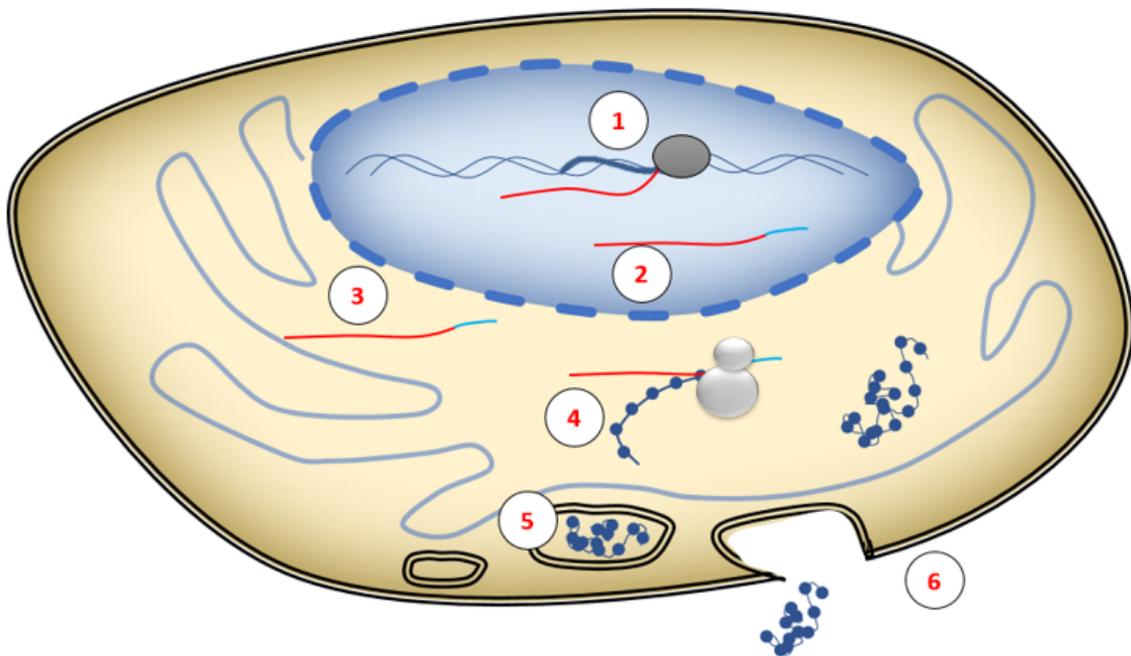


FIGURE 6 – Carte du vecteur plasmidique pJET1.2/blunt Il comporte un gène létale d'une endonucléase ECO47IR au milieu duquel le plasmide est linéarisé. Si l'insert n'est pas intégré, le plasmide autocircularisé sera exploité par la bactérie qui traduira le gène de l'endonucléase et mourra.



Légende			
	- Cellule eucaryote		- Reticulum endoplasmique
	- Noyau de la cellule		- Ribosome
	- ADN double brin (en gras, un gène est représenté)		- Protéine en cours de synthèse
	- ARN Polymérase type II		- Protéine mature
	- ARN pré-messager (non mature)		- Appareil de Golgi, vacuole
	- ARN messager (mature)		

FIGURE 7 – **Schéma d'une cellule eucaryote.** **1** : *Transcription* de l'ADN en ARN pré-messager ; **2** : ARN pré-messager après maturation, dans le noyau (élimination des introns ; **3** : ARN messager dans le réticulum endoplasmique ; **4** : *Traduction* de l'ARN messager en protéine et maturation de celle-ci ; **5** : Transport à la surface de la cellule via l'appareil de Golgi ; **6** : sécrétion.

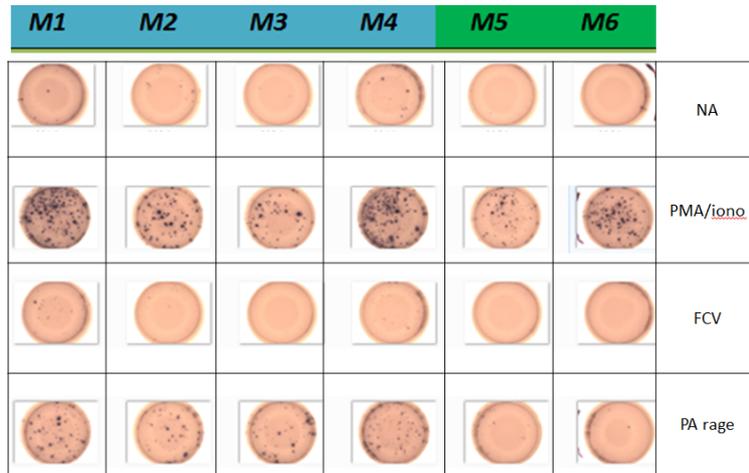


FIGURE 8 – Photo des puits de l’essai ELISPOT sur cellules fraîches du protocole clinique 1. Le nombre de spots est automatiquement compté par le lecteur.

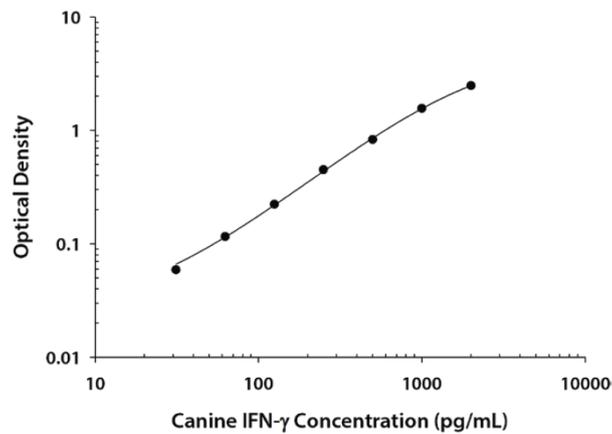


FIGURE 9 – Modèle de courbe obtenue avec les standards IFN γ du kit «Canine IFN-gamma DuoSet ELISA»[®] (R&D systems[™])

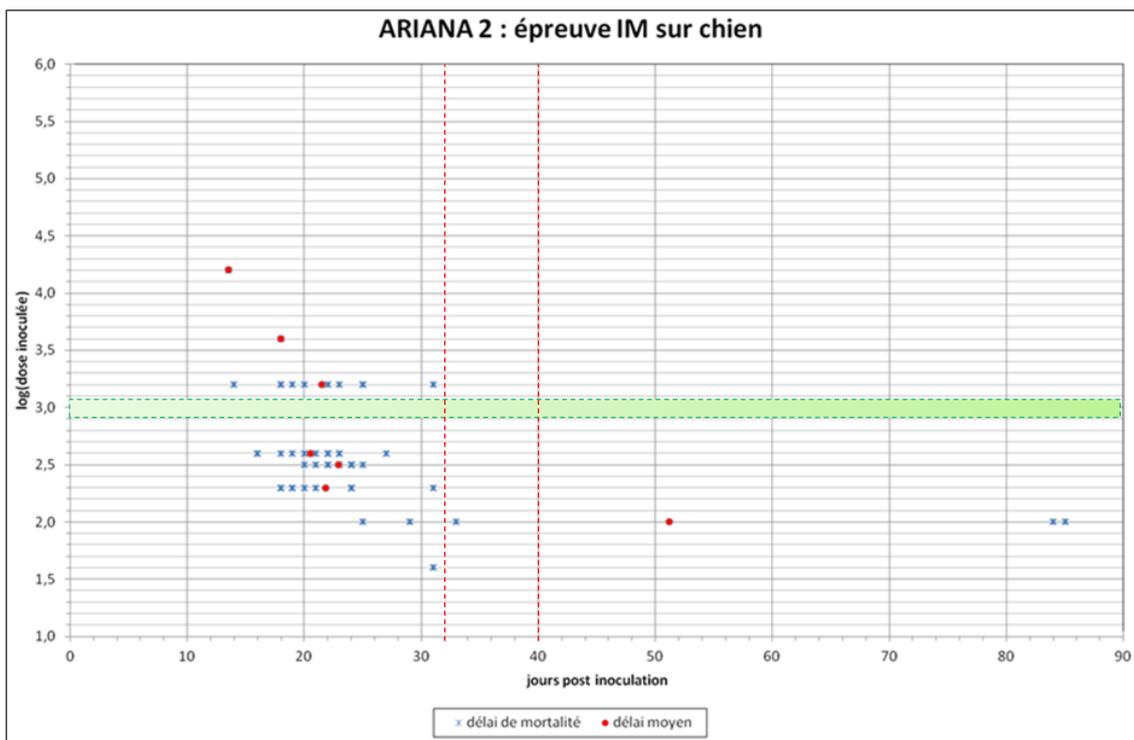


FIGURE 10 – Historique des délais de mortalité de chiens avec la souche virale ariana 2, selon la dose inoculée en intramusculaire.

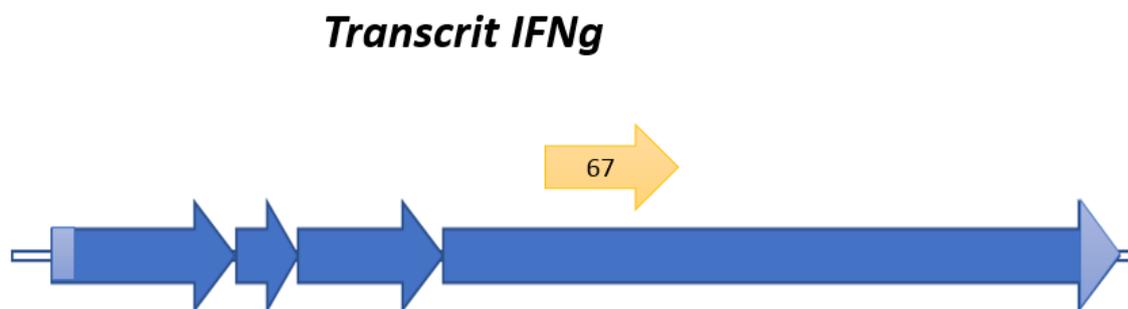


FIGURE 11 – Représentation schématique de l'ARN messenger de IFN γ avec placement des Exons (bleu), et de l'amplicon de qPCR (jaune).

Transcrit IL4

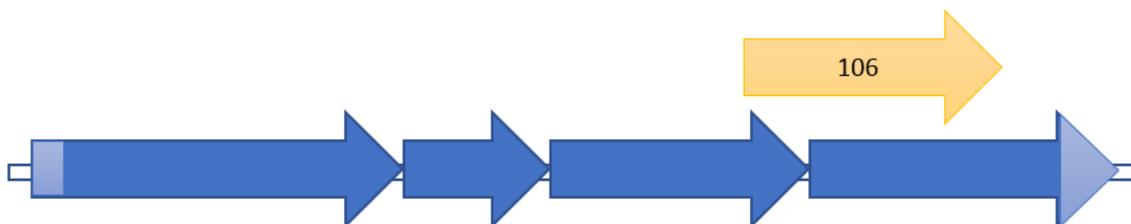


FIGURE 12 – Représentation schématique de l'ARN messager de IL-4 avec placement des exons (bleu), et de l'amplicon de qPCR (jaune).

Transcrit GAPDH

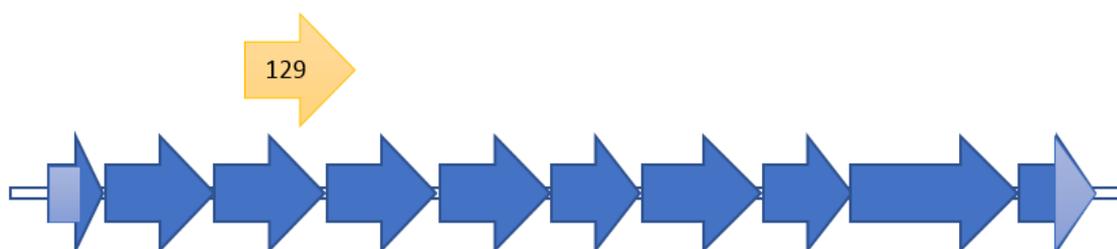


FIGURE 13 – Représentation schématique de l'ARN messager de GAPDH avec placement des Exons (bleu), et de l'amplicon de qPCR (jaune).

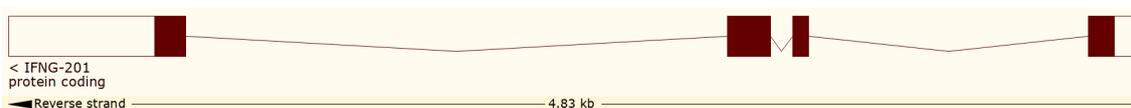


FIGURE 14 – Représentation schématique du gène de IFN γ avec placement des Exons (rectangles rouges), et des introns (traits rouges) qui seront clivés à la maturation de l'ARN messenger. ref. : www.ensembl.org



FIGURE 15 – Représentation schématique du gène de IL-4 avec placement des Exons (rectangles rouges), et des introns (traits rouges) qui seront clivés à la maturation de l'ARN messenger. ref. : www.ensembl.org

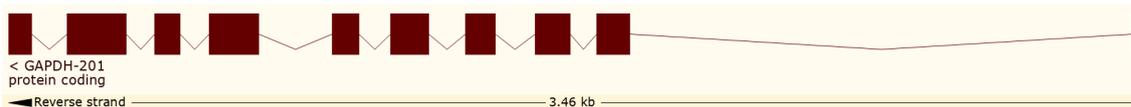


FIGURE 16 – Représentation schématique du gène de GAPDH avec placement des Exons (rectangles rouges), et des introns (traits rouges) qui seront clivés à la maturation de l'ARN messenger. ref. : www.ensembl.org

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES
ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

**"Etude de l'immunité cellulaire après vaccination antirabique chez le chien,
mise au point d'une nouvelle méthode de qPCR"**
Mélanie BADRE-BIARNAIS