



HAL
open science

Développement d'un vaccin à ADN contre le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV)

Cindy Bernelin-Cottet

► **To cite this version:**

Cindy Bernelin-Cottet. Développement d'un vaccin à ADN contre le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV). Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLA004 . tel-02130476

HAL Id: tel-02130476

<https://theses.hal.science/tel-02130476>

Submitted on 15 May 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.

Développement d'un vaccin à ADN contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV)

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech (institut des Sciences et Industries du Vivant et de
l'Environnement)

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement,
santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 28 Février 2019, par

Cindy Bernelin-Cottet

Composition du Jury :

Roger Le Grand Directeur de recherches ; CEA Fontenay-aux-Roses (U1184 Centre de recherche en immunologie des infections virales et des maladies auto-immunes)	Président
Jennifer Richardson Directeur de recherches ; ANSES, ENVA, INRA Maisons-Alfort (UMR1161 Unité de virologie)	Rapporteur
Daniel Dory Chef de projets scientifiques ; ANSES Ploufragan-Plouzané-Niort (Unité génétique virale et biosécurité)	Rapporteur
Mathieu Epardaud Chargé de recherches ; INRA Val de Loire (UMR1282 Infectiologie et santé publique)	Examineur
Isabelle Schwartz-Cornil Directeur de recherches ; DVM, INRA Jouy-en-Josas (UR892 Virologie et Immunologie Moléculaire)	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury, **Roger Le Grand**, **Jennifer Richardson**, **Daniel Dory** et **Mathieu Epardaud** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et pour le temps que vous y avez passé. Je remercie également les membres de mes comités de thèse, **Claude Leclerc**, **Olivier Bourry**, **Mathieu Epardaud** et **Anne Moore** pour les échanges que nous avons pu avoir et leurs conseils.

Je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse **Isabelle Schwartz-Cornil** sans qui ce travail n'aurait pas pu être mené. Je te remercie de m'avoir proposée une thèse qui correspondait à mon profil. Je te remercie de m'avoir accueillie au sein de l'équipe V2i. Étant plutôt virologue qu'immunologiste, tu as su partager tes connaissances avec une précision et une patience que j'apprécie particulièrement. Tes nombreux enseignements disciplinaires théoriques et pratiques et la rigueur avec laquelle tu m'as formée durant ces années de thèse m'ont faite murir et je t'en suis reconnaissante. Je me souviens de ma première observation expérimentale à Nouzilly parmi les moutons, mais surtout des premières expérimentations sur nos porcs et ma réticence des injections. Je te remercie de m'avoir permise de participer à différents congrès, d'avoir suivi des cours en vaccinologie pour l'obtention d'un diplôme. Je n'aurai pas la place de tout écrire et de te remercier convenablement mais par-dessus tout, je retiens ton humanité, ta gentillesse, nos échanges animaliers (petite pensée pour **Uluru**, **Mushu** et **Ratus**). Merci pour tout ce que tu m'as apportée.

Céline Urien, je te remercie pour ton professionnalisme et ton aide précieuse pour la réalisation de cette thèse. Sans toi je n'aurai pas pu analyser tous nos échantillons et ta rapidité nous a tellement facilité le traitement des données. Merci pour ta gentillesse, et les bons moments passés ensemble.

Un grand merci aux membres de l'équipe V2i de l'INRA de Jouy-en-Josas, **Sabine Riffault**, **Nicolas Bertho**, **Delphyne Descamps**, pour nos échanges et vos conseils durant ma thèse. **Edwige Bouguyon** je te remercie pour ton aide précieuse et les formations que tu m'as donnée durant la thèse, mais aussi ta gentillesse.

Je tiens à remercier vivement nos animaliers de la Plate-Forme d'Infection Expérimentale (PFIE) de l'INRA de Nouzilly pour votre temps, patience, joie de vivre et professionnalisme. Je suis ravie d'avoir fait la connaissance de **Céline Barc** avec qui je me suis liée d'amitié, **Alexis Pléau**, **Jérémy Pezant** et **Olivier Boulesteix** avec qui nous avons beaucoup ri tout en

travaillant de manière vraiment efficace, mais surtout je retiens que la contention est la clef du prélèvement sanguin ! Merci à toute l'équipe en charge des expérimentations animales.

Je remercie également toutes les personnes de l'unité VIM de l'INRA Jouy-en-Josas pour nos échanges scientifiques et personnels, ainsi que votre aide pour la réalisation de ce travail, mais surtout votre accueil chaleureux. Merci à **Cindy Carpentier**, avec qui je me suis de lier d'une grande amitié et qui m'a soutenue durant la thèse, m'a redonnée confiance, nos fous rires, nos passions communes et la découverte de ta petite famille, mais également **Catherine Dubuquoy, Fabienne Reine, Laëticia Herzog, Elodie Coulamy** et **Stéphanie Gangnebien** vous m'avez accueillie les bras ouverts et votre bonne humeur enjolivaient mes journées. Merci à **Maxence Frétaud, Christelle Langevin, Luc Jouneau, Christophe Chevalier, Ronan Le Goffic, Bruno Da Costa, Stéphane Biacchesi, Mohamed Moujou**. Merci à l'unité GABI de Jouy-en-Josas notamment **Jean-Jacque Leplat** et **Fany Blanc** pour votre aide et votre professionnalisme. J'encourage tous les thésardes et thésards de l'unité VIM, « l'obstination est le chemin de la réussite ».

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et votre aide pour la réalisation de ce travail : nos partenaires bretons **Olivier Bourry, Patricia Renson, Sophie Mahe** ; nos partenaires suisses **Christophe Barnier-Quer** et **Virginie Jakob** ; nos partenaires irlandais **Anne Moore** et **Joanna McCaffrey** ; nos partenaires belges **Hans Nauwynck, Ivan Trus** et **Sandra Verman** ; nos partenaires norvégien **Agnete Brunsvik** et **Elisabeth Stubrud**, ainsi que toutes les personnes que je n'aurai pas cité. Merci à **Bruno Peiffer** pour votre aide généreuse.

À **Emmanuel Bréard** avec qui j'ai beaucoup appris lors de mon stage de Master2 et tu m'as donnée le goût pour la science et plus particulièrement la virologie. Un grand merci à **Alexandra** qui m'a soutenue et qui m'a préparée à la thèse. Je ne te remercierai jamais assez. **Annabelle**, mon amie, merci pour tes formations et ta joie de vivre.

Je remercie l'homme qui partage ma vie, **Sévan**, pour tes conseils, tes mots doux et chaleureux, t'avoir surpassé la non-envie de faire les repas, d'avoir supporté (et le mot est faible) mon caractère déjà pas très facile et mes humeurs de fatigue.

Merci à mes meilleurs amis, **Jenny** (et **Lonis**), **Fab(ien)**, **Fiona** et **Alexandre** pour votre soutien à tous les niveaux, pour votre joie de vivre et tous ces moments que l'on passe ensemble depuis 16 ans pour certaine !

À mes collègues devenus mes amis proches, Sayidati **Lynda**, **Vincent**, **Célia** et **Bertrand**. Vous m'avez redonnée la joie de vivre, nos lancées de boulettes (pas les pièces) me manqueront, nos fous rires, nos « petites farces » de bureaux. Courage pour vos thèses (sauf pour petio), je vous soutiens et je vous aiderai comme je peux, j'ai hâte de venir voir les projets finaux, de toute façon, on continue de se voir en dehors ☺.

À ma **Rider Family Crew**, mes fanfouettes, nos soirées, nos vacances, nos journées sur circuit, nos fous rires et j'en passe tellement... Merci à vous tous pour votre soutien mais aussi mes amis motards qui me soutiennent depuis le début !

Mes amis strasbourgeois **Emma**, **Antoine**, vos thèses vont bien se passer, bientôt votre tour et mon retour sur Strasbourg pour de bons moments.

Pour finir, je remercie mes **parents**, ma **Ninine**, ma **Candice**, ma **sœur**, mon **beau-frère** pour votre soutien moral et vos encouragements qui me vont droit au cœur. Je vous dédie cette thèse.

Table des matières

I.	Liste des abréviations	12
II.	Liste des figures et des tableaux.....	14
III.	Introduction	17
A.	Le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV).....	17
1.	Historique	17
2.	Composants viraux	18
a.	Organisation génomique	18
b.	Protéines non structurales.....	19
i.	La protéine non structurale 1 ou nsp1	19
ii.	La polymérase virale nsp9 ou RdRp.....	21
c.	Protéines structurales.....	22
i.	La glycoprotéine 4 ou GP4.....	22
ii.	La glycoprotéine 5 ou GP5	23
iii.	La protéine de matrice M.....	23
iv.	La nucléoprotéine virale N	24
3.	L'entrée virale, les cellules infectées et le cycle viral	25
a.	Les récepteurs CD169 et CD163.....	25
b.	Autres récepteurs et facteurs intracellulaires des PRRSV.....	26
c.	Les cellules cibles des PRRSV	27
d.	Cycle viral	28
4.	Symptômes chez le porc et co-infections	29
a.	Transmission et symptomatologie.....	29
b.	Biosécurité.....	30
c.	Diagnostic de la maladie	31
d.	Co-infections associées au PRRSV	32
e.	Les virus influenza porcins	33

B.	Les réponses immunitaires contre les PRRSV	34
1.	Immunité innée contre les PRRSV.....	34
a.	Les phagocytes mononucléés chez les mammifères et en particulier chez le porc 35	
i.	Macrophages (M θ) issus de précurseurs embryonnaires	36
ii.	Les monocytes et cellules dérivées des monocytes	37
iii.	Cellules dendritiques (DC) bona fide	38
b.	Les lymphocytes Natural Killer (NK)	40
c.	Les mécanismes d'échappement à la réponse innée	40
2.	Immunité adaptative contre les PRRSV	41
a.	Les réponses humorales	41
i.	Les anticorps non-neutralisants (non-NAbs).....	42
ii.	Les anticorps neutralisants (NAbs).....	43
b.	La réponse lymphocytaire T (ou réponse cellulaire T)	44
i.	Implication des cellules T CD4 ^{pos} , CD8 ^{pos} et CD4 ^{pos} /CD8 ^{pos}	44
ii.	Régions antigéniques ou épitopes T	46
iii.	Les réponses T régulatrices	47
C.	La vaccination contre les PRRSV	48
1.	Les vaccins contre les PRRSV	48
a.	Les vaccins atténués	48
b.	Les vaccins inactivés	49
c.	La génétique inverse.....	49
d.	Les vaccins avec protéines recombinantes et vaccins vectorisés	50
e.	Les vaccins à ADN.....	50
2.	Les modes d'administration non muqueuse des vaccins et cas particulier de la vaccination à ADN	53
a.	Les voies d'injection des vaccins	53
i.	La voie intramusculaire (IM)	53

ii.	La voie sous-cutanée	55
iii.	La voie intradermique (ID).....	55
iv.	La voie transcutanée avec des micro-aiguilles	56
v.	La voie transcutanée sans microaiguille ou épicutanée.....	57
b.	Les méthodes de vaccination à ADN et les sites d'injection	57
i.	Les voies intramusculaire et intradermique.....	58
ii.	L'électroporation	58
iii.	Les jets sous pression sans aiguilles intramusculaires ou intradermaux	59
iv.	Les micro-aiguilles	59
v.	La vaccination par tatouage	60
vi.	Le gene-gun	60
vii.	Les formulations	60
D.	Le ciblage des cellules présentatrices d'antigène (APC-targeting) ou ciblage des cellules dendritiques (DC-targeting)	62
1.	Ciblage moléculaire des APC	63
a.	Les anticorps fusionnés aux antigènes	63
b.	Les anticorps à fragment unique à chaîne unique ou ScFv	64
c.	Les vaccibodies	64
d.	Les anticorps fusionnés aux antigènes par des liaisons non covalentes.....	65
2.	Les récepteurs ciblés	65
a.	DEC205	65
b.	CD11c.....	66
c.	XCR1.....	67
3.	Adjuvants	68
IV.	Objectifs	73
V.	Résultats	77
	Article n°1 : « Un vaccin influenza universel peut conduire à une exacerbation de la maladie ou à un contrôle viral selon la voie d'injection »	77

Article n°2 : « Évaluation des propriétés immunogéniques de vaccins à ADN administrés avec ou sans des nanoparticules, par électroporation ou avec des patches à micro-aiguilles dans la peau de porc»	96
Article n°3 : « Une stratégie de prime-boost à vaccin à ADN - vaccin atténué (MLV) étend la réponse lymphocytaire T et augmente la réponse humorale contre le PRRSV ».....	134
Article n°4 : « Une primo-vaccination à ADN nu potentialise les réponses immunes induites par un vaccin atténué (MLV) contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin mais n'induit pas de protection hétérologue»	164
VI. Discussion et perspectives.....	198
VII. Bibliographie.....	208
VIII. Annexes.....	228
Annexe 1 – Autres publications	228
Annexe 2 – Liste des congrès nationaux et internationaux	228
Annexe 3 – Liste des posters présentés	229
Annexe 4 – Formations suivies et diplômes.....	229

I. Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADCDC	Antibody Dependent Complement-mediated Cytotoxicity
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADE	Antibody-Dependent Enhancement
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag/AG	Antigène
APC	Antigen Presenting Cells
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
cDC-1 / 2	Conventionnal Dendritic Cell 1 or 2
CDP	Common DC Progenitor
CMH class I/II	Complexe Majeur d’Histocompatibilité de classe I ou II
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
Ctrl	Groupe contrôle
DC	Dendritic Cell
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DIVA	Differentiating Infected versus Vaccinated Animals
DMN	Dissolvable microneedles
dpi	Days post-infection
E	Protéine d’enveloppe des PRRSV
ELISA	Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Liked ImmunoSpot Assay
EP	Electroporation
FL07	Souche PRRSV-1 Flanders 07
FL13	Souche PRRSV-1 Flanders 13
FL13b	FL13 atténuée
GABI	unité Génétique Animale et Biologie Intégrative
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GP	Glycoprotéine des PRRSV
H1N1pdm09	H1N1 pandémique 2009
HA	Héماغlutinnine des virus influenza
HA2	Tige de HA des virus influenza
high	High (élevée) en exposant
ID	Intradermique
IFN-I	Interféron de type 1
IFN$\alpha/\beta/\gamma/\lambda$	Interféron alpha ou bêta ou gamma ou lambda
IgA/G/M	Immunoglobuline A ou G ou M
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
INRA	Institut Nationale de la Recherche Agronomique
int	Intermédiaire en exposant
IRF	Interferon regulatory factor
kDa	kiloDalton
KO	Knock-out
LC	Langerhans Cell
low	Low (faible) en exposant
M	Protéine de la matrice des PRRSV
M2e	Domaine extracellulaire de la protéine matrice 2 des virus influenza
MARC-145	Meat Animal Research Center – cellules rénales de singes MA-104
MLV	Modified Live Vaccine
MoDC	Monocyte-derived Dendritic Cell
MoM0	Monocyte-derived Macrophages
M0	Macrophage
N	Nucléoprotéine des PRRSV
NA	Neuramidase des virus influenza
NAbs	Neutralizing Antibodies
neg	Négatif

NK	Cellules Natural Killer
Non-NAbs	non-Neutralizing Antibodies
NP	Nucléoprotéine des virus influenza
nsp	non structural protein PRRSV
ORF	Open Reading Frame
PAMs	Porcine Alveolar Macrophages
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PFIE	Plate-Forme d'Infection Expérimentale
PJ	Pharmajet Tropis®
PLGA NP	Poly lactico-glycolic acid nanoparticles
pLuc	Plasmide Luciférase
pos	Positif (en exposant)
PRRSV	PRRSV-1 ou -2 (sous-type)
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase des PRRSV
RT-qPCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SA	Streptavidine
SAPHIR	Strengthening Animal Productions and Health through Immune Responses
scCD11c	ScFv anti-CD11c
ScFv	Single chain variable Fragment
SIRPα	<i>Signal regulatory protein α</i>
TLR	Toll-Like Receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
Treg	regulatory T cells
UT	Untargeted
V2i	Équipe Vaccins, Virus Immunopathologie de l'unité VIM
VB	Vaccibodies
VC	Vaccicomplexes
VIH	Virus Immunodéficience Humain
VIM	Virologie et Immunologie Moléculaires
XCR1	Chemokine XC receptor 1

II. Liste des figures et des tableaux

Figure 1 - Classification des PRRSV	18
Figure 2- Représentation schématique d'un PRRSV	20
Figure 3 - Topologie des protéines structurales de l'enveloppe lipidique des PRRSV	22
Figure 4 - Représentation schématique des interactions entre les protéines de l'enveloppe des PRRSV et les molécules de surface cellulaire	27
Figure 5 - Schéma du cycle de réplication des Arterivirus	28
Figure 6 - Photographies de symptômes d'une infection par le PRRSV	30
Figure 7 - Représentation schématique d'une particule virale influenza A	34
Figure 8 - Modèle de classification des phagocytes mononucléés et leurs précurseurs.....	36
Figure 9 - Représentation des réponses immunes induites chez le porc lors d'une infection par les PRRSV.....	41
Figure 10 - Comparaison des séquences en acides aminés des régions antigéniques des lymphocytes T identifiées entre différentes souches PRRSV-1 et la souche VR2332, prototype des PRRSV-2.....	47
Figure 11 - Schéma des différentes méthodes d'immunisation et leur zone de diffusion	54
Figure 12 - Planche photographique de quelques techniques utilisées en vaccination à ADN (A, B, D, E, G, H, I, J, photos prises par moi-même dans les expérimentations de ma thèse)	61
Figure 13 - Représentation de différentes stratégies utilisées pour l'APC-targeting	63
Figure 14 - Arbre phylogénétique de différentes souches du PRRSV-1.....	200
Figure 15 - Photographies in situ et macroscopiques de la peau de porc après électroporation et application des patches à micro-aiguilles	202
Table 1 - Comparaisons des phénotypes des différentes sous-populations de cellules dendritiques trans-espèces.....	38

Introduction

III. Introduction

A. Le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV)

1. Historique

Le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin a été décrit pour la première fois en 1987 aux États-Unis et dans les années 1990 en Europe (**Butler et al. 2014**(Butler et al., 2014)). Depuis, le syndrome est endémique dans la majorité des régions productrices de porcs (par exemple, 60 % de prévalence en Bretagne). Cette maladie est considérée comme la plus coûteuse dans les élevages porcins à l'échelle mondiale. Les pertes de production dans l'industrie porcine ont été évaluées à près de 664 millions de dollars par an aux États-Unis et 1503 millions d'euros dans une grande partie de l'Europe.

Les virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus – PRRSV en anglais) appartiennent au genre Porarterivirus de la famille des Arteriviridae (ordre des Nidovirales). Les autres membres de cette famille sont l'Equine Viral Arteritis, le Lactate Dehydrogenase Elevating Virus de souris, et le Simian Hemorrhagic Fever Virus. Tous les membres de l'ordre des Nidovirales sont des virus enveloppés avec un génome à ARN linéaire simple brin de polarité positive (**Kuhn et al. 2015**). Les PRRSV sont répartis en deux génotypes : les virus du génotype 1 (PRRSV-1) sont principalement répandus en Europe et les virus du génotype 2 (PRRSV-2) sont retrouvés principalement en Amérique du Nord (**Dokland 2010, revue**). Ces deux génotypes partagent une identité nucléotidique de 50 – 60 % (**Fang et al. 2007, rapport**). Les deux génotypes ont émergé presque simultanément sur les deux continents et ils se sont répandus à travers le monde. Depuis, PRRSV-1 a toutefois été isolé aux États-Unis, au Canada, en Chine ainsi qu'en Thaïlande mais il n'y est pas majoritaire. PRRSV-2 a été introduit en Europe en 1996 probablement via l'utilisation d'un vaccin atténué dans des troupeaux danois (**Shi et al. 2010, revue**).

Les PRRSV-1 ont une grande diversité génétique et ils sont répartis en sous-types : les souches de l'Europe de l'Ouest appartiennent au sous-type 1, et les souches de l'Europe de l'Est appartiennent aux sous-types 2, 3 et 4 (**Figure 1A**) (**Shi et al. 2010, revue**). Sur la base d'une terminologie historique utilisée par les virologistes, les virus du sous-type 1 sont classés en "clades" et les PRRSV-2 sont classés en lignées virales (**Figure 1B**). La diversité génétique entre les clades du sous-type 1 est du même ordre que la diversité entre les lignées du génotype 2.

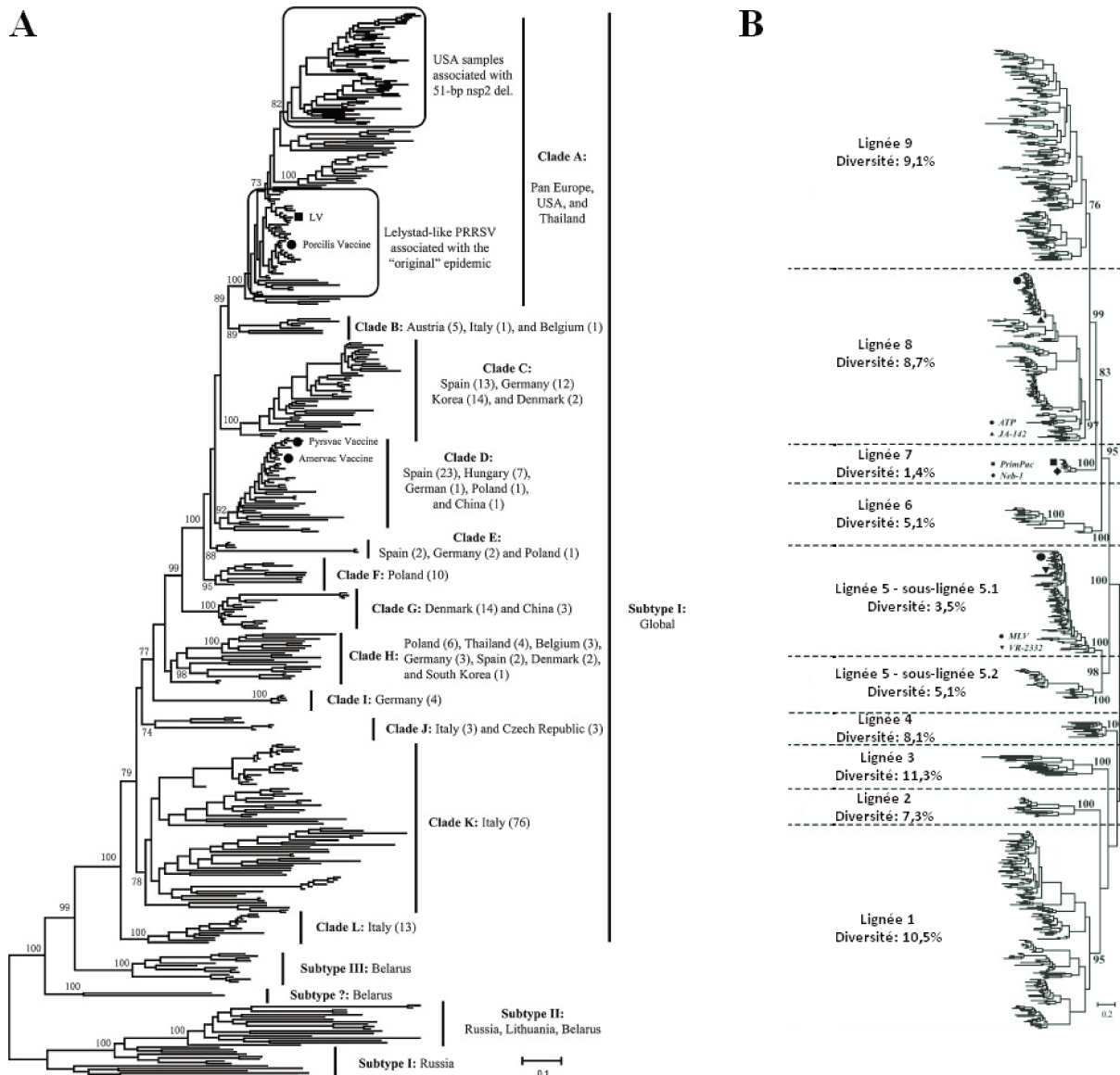


Figure 1 - Classification des PRRSV

A. Génotype 1 basée sur l'alignement des séquences de l'ORF5

B. Génotype 2

Extrait de (Shi et al. 2010, revue).

2. Composants viraux

a. Organisation génomique

Le génome monopartite linéaire du PRRSV est un ARN simple brin de polarité positive. La taille du génome est d'environ 15 kilobases. La région 3' terminale est polyadénylée et la région 5' terminale est composée d'une structure similaire à une coiffe. Le génome contient onze cadres de lecture ouverts (Open Reading Frames – ORF en anglais) (**Figure 2A**). L'ORF1a et l'ORF1b sont traduits directement à partir de l'ARN génomique, en

polyprotéines pp1a et pp1b respectivement, qui sont maturées en quatorze protéines non structurales. Les ORF2 à 7 sont traduits à partir d'ARN messagers (ARNm) subgénomiques, précurseurs de huit protéines structurales (**Kuhn et al. 2015**).

b. Protéines non structurales

Le complexe de réplication est codé par les ORF1a et 1b qui constituent environ 75% du génome viral. Les protéines non structurales (non-structural proteins - nsp en anglais) sont impliquées dans la réplication virale. L'ORF1a code les protéines nsp1 α - β , nsp2 à 6, nsp7 α - β et nsp8 (**Figure 2A**). Ces protéines virales sont nécessaires à la régulation de l'expression des gènes de la machinerie de réplication ainsi qu'à l'interaction du complexe de réplication avec le génome. Les nsp1, 2 et 4 ont une activité protéolytique et clivent les polyprotéines pp1a et pp1b.

L'ORF1b code les protéines nsp9 à 12 (**Butler et al. 2014**). Ces protéines sont indispensables à la réplication virale. Nsp9 code l'ARN polymérase ARN dépendant (RNA dependent RNA polymerase – RdRp en anglais), nsp10 code l'ARN hélicase, nsp11 code l'endoribonucléase dite des Nidovirus (NendoU) et nsp12 jouerait un rôle dans le recrutement de protéines cellulaires pour avantager la réplication virale (**Dong et al. 2016**).

Deux protéines non structurales (nsp1 et RdRp) sont davantage détaillées ci-après car elles seront utilisées dans ma thèse comme antigènes.

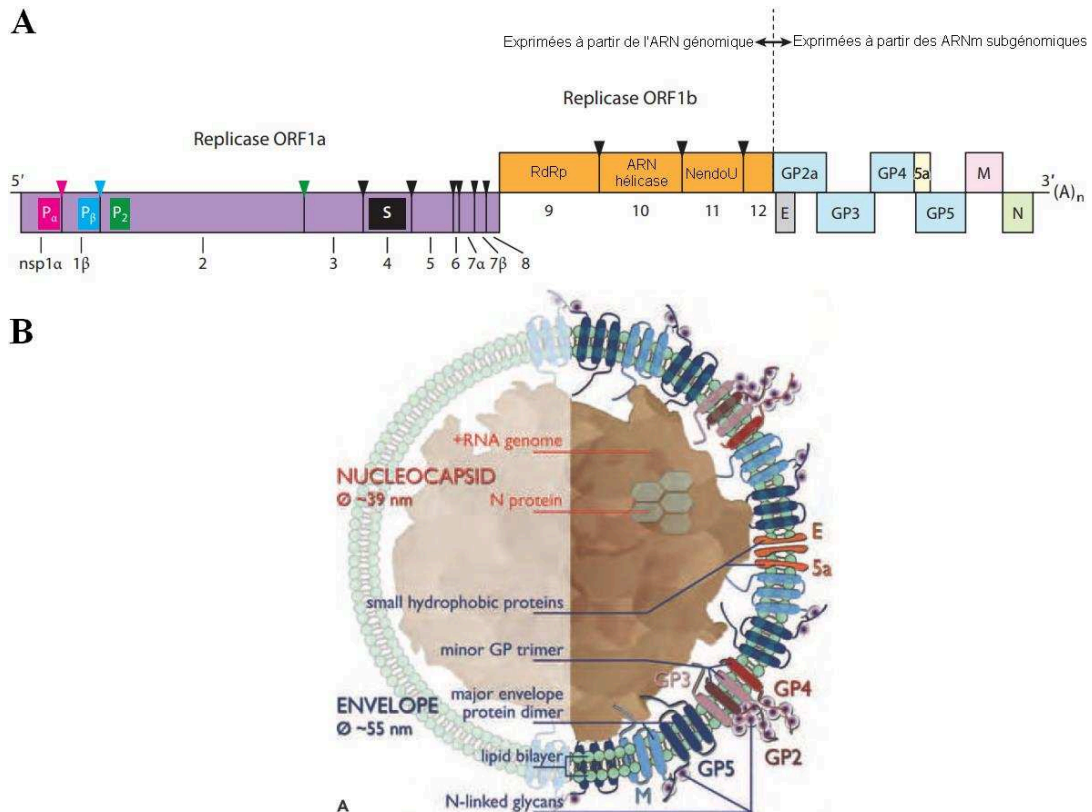
i. La protéine non structurale 1 ou nsp1

Codée par l'ORF1a, nsp1 est exprimée précocement dans le cytoplasme des cellules infectées. C'est une protéine multifonctionnelle importante de 383 acides aminés (aa) (**Rascón-Castelo et al. 2015, revue**). L'homologie de séquence des acides aminés de nsp1 est d'environ 89,5 % entre les souches du PRRSV-1, et d'environ 52,2 % entre les PRRSV-1 et PRRSV-2 (**Darwich et al. 2011**). Son activité auto-protéolytique conduit à sa maturation ainsi que celle de nsp2 en clivant les liaisons peptidiques de la polyprotéine pp1a. Elle réalise un autre auto-clivage et elle est alors maturée en deux protéines nsp1 α et nsp1 β . Nsp1 régule également la transcription des ARNm viraux subgénomiques (**Rascón-Castelo et al. 2015, revue**).

La taille de la protéine nsp1 α est de 180 aa pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 (**Lunney et al. 2016, revue**) d'environ 19 kDa. Nsp1 α contient un domaine doigt de zinc suivi d'un domaine protéolytique de la famille des papaïnes et d'une courte terminaison C terminale (**Dokland 2010, revue**). La taille de la protéine nsp1 β est de 205 aa et de 203 aa pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 respectivement (**Lunney et al. 2016, revue**) d'environ 43 kDa. Nsp1 β contient un domaine nucléasique suivi d'un domaine auto-protéolytique de la famille des papaïnes (**Dokland 2010, revue**). Nsp1 β est retrouvée sous forme de dimères par l'interaction de ses domaines nucléases. Nsp1 α et nsp1 β sont des antagonistes de la réponse interféron de type 1 (IFN-I). Elles inhibent l'activité du promoteur des gènes IFN-I en interférant sur le facteur de transcription IRF3 et en inhibant la phosphorylation d'I κ B α (**Rascón-Castelo et al. 2015, revue**). De plus, nsp1 α dégrade la protéine CREB (C-AMP Response Element-binding protein - facteur de transcription liant l'AMPc, l'adénosine monophosphate cyclique), empêchant le recrutement d'IRF3 à l'enhanceosome et réduisant ainsi l'induction d'IFN-I (**Rascón-Castelo et al. 2015, revue**).

Figure 2- Représentation schématique d'un PRRSV

- A. Organisation schématique de l'ARN génomique viral. Les ORF1a et ORF1b sont traduites à partir de l'ARN génomique en polyprotéines pp1a et pp1b respectivement, et ces polyprotéines seront maturées en 14 protéines non structurales (nsp). L'ORF1a code les nsp1 à 8. Les papaïnes (des protéases à cystéine – P α , P β , P2) clivent la pp1a en nsp1 α (triangle rose), nsp1 β (triangle bleu) et nsp2 (triangle vert). La protéase à sérine (S) clive pp1a à différents sites de clivages (triangles noirs) pour générer les nsp3 à 8. (S) clive pp1b à différents sites de clivages (triangles noirs) pour générer les nsp9 à 12 codées par l'ORF1b. Les nsp 9 à 12 sont impliquées dans le complexe de réplication et de transcription du génome infectieux viral. Ces nsp sont l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp – nsp9), l'ARN hélicase (nsp10), une endoribonucléase (NendoU – nsp11) et nsp12. À partir d'ARNm subgénomiques, les ORF2 à 7 codent les protéines structurales E, GP2, GP3, GP4, G5a, GP5 et M, et N. Extrait de (**Lunney et al. 2016, revue**).
- B. Localisation schématique des protéines structurales de l'enveloppe composée de glycoprotéines (GP), de protéines de l'enveloppe (E) et de protéines membranaires (M), et de la nucléocapside composée de nucléoprotéines (N) et de l'ARN génomique (**Snijder and Kikkert, Arteriviruses, Virology 2013, livre**).



ii. La polymérase virale nsp9 ou RdRp

Codée par l'ORF1b, la polymérase virale RdRp est la protéine non structurale la plus conservée parmi les virus de l'ordre Nidovirales avec une homologie de séquence des acides aminés d'environ 97,9 % entre les souches PRRSV-1, et d'environ 74 % entre les PRRSV-1 et PRRSV-2 (**Darwich et al. 2011**). La RdRp est l'ARN polymérase ARN dépendante des PRRSV. Sa taille est de 685 aa (**Lunney et al. 2016, revue**) pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 d'environ 71 kDa. Elle est responsable de la réplication virale dans le cytosol des cellules infectées ainsi que de la transcription en ARNm génomiques et subgénomiques. La RdRp interagit également avec des protéines cellulaires pour faciliter la réplication virale (**Liu et al. 2016**). La diversité de souches virales PRRSV s'explique par une RdRp peu processive induisant des mutations génétiques avec un taux d'évolution génétique élevé de l'ordre de 10^{-2} /site/an à la différence des autres virus à ARN génomique de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} /site/an (**Hanada et al. 2005**). L'infidélité de la RdRp entraîne l'apparition de quasi-espèces durant la réplication. L'évolution et la stabilité de ces quasi-espèces dépendent des mutations induites. La variabilité génétique des souches PRRSV s'explique également par un autre phénomène qui est la recombinaison génétique inter-souches.

c. Protéines structurales

Les PRRSV sont composés d'une enveloppe lipidique qui entoure une nucléocapside sphérique de 25 - 35 nm (**Figure 2B**). L'enveloppe est constituée de sept protéines structurales (**Figure 2B**) : les glycoprotéines (GP) GP2 à 5, deux types de protéines non glycosylées de la matrice (M) et de l'enveloppe (E), et enfin la protéine (5a). Ces protéines sont codées par les ORF2 à 6. La capsid virale est constituée d'une protéine structurale non glycosylée, la nucléoprotéine (N), codée par l'ORF7.

La couche lipidique est composée de deux protéines majeures, la protéine de matrice M et la glycoprotéine GP5 formant un hétérodimère, essentiel pour l'infectiosité virale. Les protéines mineures de l'enveloppe virale sont les glycoprotéines GP2, GP3 et GP4 qui forment un complexe protéique avec la protéine de l'enveloppe E (**Figure 2B**). Ces deux complexes protéiques viraux sont impliqués dans les premières étapes d'infection : l'attachement et l'entrée virale dans les cellules cibles (**Snijder and Kikkert, Arteriviruses, Virology 2013, livre**).

Les protéines structurales GP4, GP5, M et N, qui sont utilisées dans mon travail expérimental de thèse sont plus particulièrement décrites ci-dessous.

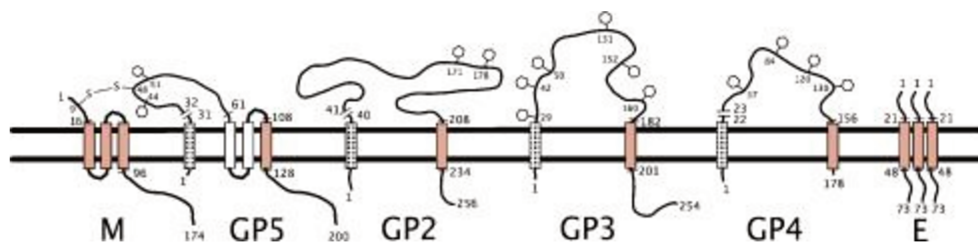


Figure 3 - Topologie des protéines structurales de l'enveloppe lipidique des PRRSV

Les rectangles orange représentent les domaines transmembranaires. Les rectangles blancs représentent les domaines transmembranaires supplémentaires selon les souches virales. Les rectangles rayés représentent les peptides signaux prédictifs. Les coupures des lignes dans les ectodomains symbolisent les sites de clivages. Les hexagones schématisent les glycosylations au niveau de l'acide aminé correspondant. Le pont disulfure entre les protéines M et GP5 est indiqué.

Extrait de (**Dokland 2010, revue**).

i. La glycoprotéine 4 ou GP4

Codée par l'ORF4, la glycoprotéine GP4 est une protéine mineure de l'enveloppe virale de 183 et 178 aa pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 respectivement (**Lunney et al. 2016, revue**) d'environ 19,5 kDa. L'homologie de séquence des acides aminés de GP4 est d'environ 88,5 % entre les souches du PRRSV-1, et d'environ 66,8 % entre les PRRSV-1 et PRRSV-2

(**Darwich et al. 2011**). GP4 contient un peptide signal dans la région N-terminale (position 1 – 21 aa), un domaine transmembranaire (aux positions 161 – 181 aa pour le génotype 1 et 156 – 177 aa pour PRRSV-2) représentés dans la **Figure 3 (Dokland 2010, revue)**. Les résidus 58 – 70 aa de GP4 constituent un épitope linéaire qui a été décrit comme cible des anticorps neutralisants. Cet épitope est immunogénique chez le porc et il présente une grande variabilité entre les souches virales impliquant que les anticorps produits ont une réactivité souche-dépendante (**Vanhee et al. 2010**).

ii. La glycoprotéine 5 ou GP5

Codée par l'ORF5, GP5 est la protéine majeure de l'enveloppe virale de 201 et 200 aa pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 respectivement (**Lunney et al. 2016, revue**) d'environ 22 kDa. L'homologie de séquence des acides aminés de GP5 est d'environ 90 % entre les souches PRRSV-1, et d'environ 54,7 % entre les PRRSV-1 et PRRSV-2 (**Darwich et al. 2011**). Elle contient un peptide signal dans la région N-terminale (position 1 – 31 aa) suivi d'un ectodomaine d'une trentaine de résidus contenant un épitope linéaire ciblé par les anticorps neutralisants, d'un ou trois domaines transmembranaires selon les souches virales aux résidus 60 – 125 et d'un endodomaine dans la région C-terminale aux alentours des résidus 130 – 200. Ces différents domaines sont représentés dans la **Figure 3 (Dokland 2010, revue)**. GP5 compte 3 sites glycosylés putatifs (**Ansari et al. 2006**) et influence la spécificité des anticorps. GP5 serait aussi impliquée, comme GP4, dans le degré de cross-protection entre souches virales (**Butler et al. 2014**). GP5 joue un rôle dans l'initiation de l'interaction entre la cellule hôte et potentiellement dans la fusion membranaire de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

iii. La protéine de matrice M

L'ORF6 code la protéine de matrice M, la seconde protéine majeure de l'enveloppe virale de 173 et 174 aa pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 respectivement (**Lunney et al. 2016, revue**) d'environ 19 kDa. M est la protéine structurale la plus conservée avec une homologie de séquence des acides aminés d'environ 94,6 % entre les souches PRRSV-1, et est d'environ 78,8 % entre les PRRSV-1 et PRRSV-2 (**Darwich et al. 2011**). M est non glycosylée et elle ne contient pas de peptide signal. Elle est composée d'un court ectodomaine de 16 résidus dans la région N-terminale suivie de trois domaines transmembranaires et d'un endodomaine

dans la région C-terminale de 84 résidus, représentés dans la **Figure 3 (Dokland 2010, revue)**.

iv. La nucléoprotéine virale N

Codée par l'ORF7, la nucléoprotéine N est une protéine phosphorylée qui interagit avec le génome viral pour former la nucléocapside virale. Sa taille est de 128 et 123 aa pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 respectivement (**Lunney et al. 2016, revue**) avec un poids moléculaire d'environ 13,5 kDa. L'homologie de séquence des acides aminés de N est d'environ 95 % entre les souches PRRSV-1, et d'environ 58,6 % entre les PRRSV-1 et PRRSV-2 (**Darwich et al. 2011**). La protéine N constitue 20 à 40% de la quantité totale de protéines présentes dans le virion. Elle ne contient pas de peptide signal, ni de domaines transmembranaires mais elle possède un signal de localisation nucléaire à la position 41 – 47 aa (**Song et al. 2009**). Sa région N-terminale à la position 1 – 57 aa est chargée positivement et comprend un domaine RNA-binding suivi d'une séquence hydrophobe au niveau des résidus 25 – 37 et 21 – 33 pour les PRRSV-1 et PRRSV-2 respectivement (**Dokland 2010, revue**). La protéine N phosphorylée et dimérique encapside l'ARN viral probablement sous une forme hélicoïdale (**Butler et al. 2014**). Par ailleurs N interagit directement avec RdRp, affectant la production des ARN viraux (**Liu et al. 2016**). N est la protéine virale la plus immunogénique mais les anticorps précocement induits ne sont pas neutralisants. La protéine N s'accumule dans le cytoplasme et la région périnucléaire, puis elle est transportée spécifiquement dans le noyau et le nucléole de la cellule infectée. Elle interagit avec un facteur de transcription HIC (Human (I-mfa) domain-containing protein) suggérant qu'elle serait impliquée dans la régulation de la transcription cellulaire. Par ailleurs, elle interagit avec l'hélicase DHX9, conduisant à une meilleure efficacité de l'élongation des transcrits viraux (**Liu et al. 2016**). N modulerait aussi la pathogénicité des PRRSV chez le porc (**Liu et al. 2016 ; Song et al. 2009**). Elle serait impliquée dans la surexpression d'interleukine-10 (IL-10) et l'augmentation de lymphocytes T régulateurs (Treg) dans le sang durant l'infection (**Suradhat et al. 2015 ; Wongyanin et al. 2012**).

3. L'entrée virale, les cellules infectées et le cycle viral

Le porc domestique ou sauvage et le sanglier sont les seules espèces connues pour être infectées, dans des conditions naturelles par le virus (**Stankevicius et al. 2016**). Les PRRSV possèdent un tropisme pour les cellules myéloïdes, notamment les macrophages alvéolaires (Porcine Alveolar Macrophages – PAMs en anglais) aussi bien in vivo qu'in vitro. L'attachement et l'entrée virale dans les cellules cibles se fait par endocytose médiée par l'interaction de complexes protéiques viraux avec les récepteurs des PRRSV qui ont été décrits, CD163 et CD169 (**Figure 4 ; Figure 5**) (**Van Gorp et al. 2008**).

a. Les récepteurs CD169 et CD163

L'interaction du complexe protéique GP5-M avec la sialoadhésin (ou sialic acid-binding immunoglobulin [Ig]-like lectin 1 [SIGLEC-1 ; CD169]) initie l'attachement et l'internalisation des PRRSV par des vésicules de clathrine (**Prather et al. 2013**). CD169 est une glycoprotéine transmembranaire de type I d'environ 185 kDa sélectivement exprimée par les macrophages (M0) de différents organes à l'état basal et lors de l'inflammation. La région N-terminale du CD169 est un domaine de liaison à l'acide sialique, suivi d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique. Le récepteur CD169 est impliqué dans des interactions entre cellules via l'acide sialique sur les érythrocytes, les neutrophiles, les monocytes, les cellules Natural Killer, les cellules lymphocytes B et quelques lymphocytes T cytotoxiques. Des porcs génétiquement invalidés (Knock-Out - KO en anglais) pour l'expression de CD169 à la surface des PAMs restent sensibles à l'infection par le PRRSV, ce qui indique que d'autres récepteurs existent (**Prather et al. 2013**).

L'endocytose des particules virales est médiée par un second récepteur localisé dans les endosomes et qui participe à la décapsidation des PRRSV. Il s'agit du récepteur CD163 qui a été décrit pour la première fois par **Calvert et al. (Figure 4A)** et qui interagit avec le complexe protéique GP2-GP3-GP4. C'est une protéine de surface de 130 kDa restreinte à la lignée des monocytes et des M0. CD163 est une glycoprotéine transmembranaire de type I composée de neuf domaines scavenger riches en cystéines et elle intervient dans l'élimination du complexe hémoglobine-haptoglobine. CD163 est considéré comme le récepteur essentiel à l'infection par les PRRSV. Les auteurs de **Van Gorp et al.** ont surexprimé CD163 à la surface de différentes lignées cellulaires qui ne sont pas in vivo les cibles du PRRSV. Ces cellules sont devenues permissives à une infection virale. (**Wells et al. 2017**) ainsi que (**Buckard et al**

2017) ont évalué in vitro la sensibilité de M θ issus de porcs KO pour CD163 et ont montré que CD163 est indispensable à l'infection par les PRRSV-1 et PRRSV-2. De plus, la délétion du 5^{ème} domaine scavenger riche en cystéines suffit à abroger l'infectiosité des PRRSV-1 et PRRSV-2 in vitro, sans modifier l'expression membranaire de CD163 ni sa fonction de scavenger de l'hémoglobine-haptoglobine (**Buckard et al 2017**). Par contre, les motifs de CD163 impliqués dans l'infection ne sont pas les mêmes entre les deux génotypes: En effet, le remplacement du 5^{ème} domaine scavenger du CD163 porcine par la séquence humaine permet l'infection par les PRRSV-2 mais pas par les PRRSV-1. Ces résultats ont été confirmés in vivo avec quelques isolats viraux (**Wells et al. 2017**). De plus, **Yang et al.** ont démontré que des porcs KO pour CD163 sont totalement résistants contre des souches hautement pathogènes chinoises du PRRSV. CD163 est donc le récepteur indispensable pour une infection par les PRRSV.

b. Autres récepteurs et facteurs intracellulaires des PRRSV

Le phénotype des cellules influe sur l'infection par les PRRSV. En plus des récepteurs CD169 et CD163, d'autres récepteurs ont été décrits comme étant impliqués dans l'entrée virale des PRRSV (**Figure 4B**) (**Nan et al. 2017, revue ; Popescu et al. 2017, revue ; Shi et al. 2015, revue**). Les heparan-sulfates sont des polysaccharides impliqués dans l'initiation de l'attachement viral par l'interaction avec le complexe GP5-M. Le récepteur tétraspanine CD151 interagit avec la région 3' non-traduite de l'ARN génomique viral. Son rôle n'est pas défini mais il a été démontré que sa surexpression rendrait certaines lignées cellulaires permissives aux infections par les PRRSV (**Wu et al. 2014**). La vimentine est une protéine du filament intermédiaire cellulaire qui a été montrée comme facilitant l'infection. Elle jouerait un rôle dans le transport des particules PRRSV dans le cytoplasme en formant un complexe avec les autres composants de filaments intermédiaires (**Kim et al. 2006**). L'interaction du récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin ou CD209) avec le PRRSV induit l'expression des gènes pro-inflammatoires (TNF α , IL12p35, IL-1 β , IL-6) dans des cellules dendritiques dérivées de monocytes (**Piñeyro et al. 2016**). MYH9 (non-Muscle Heavy Chain 9) joue un rôle dans l'endocytose des particules virales par interaction avec GP5 (**Gao et al. 2016**). Les auteurs (**Wang et al. 2018**) ont démontré que le PRRSV pouvait se transmettre entre cellules par des exosomes cellulaires contenant des génomes viraux infectieux ainsi que certaines protéines structurales virales. Ces exosomes peuvent alors infecter à la fois des cellules sensibles et insensibles au PRRSV.

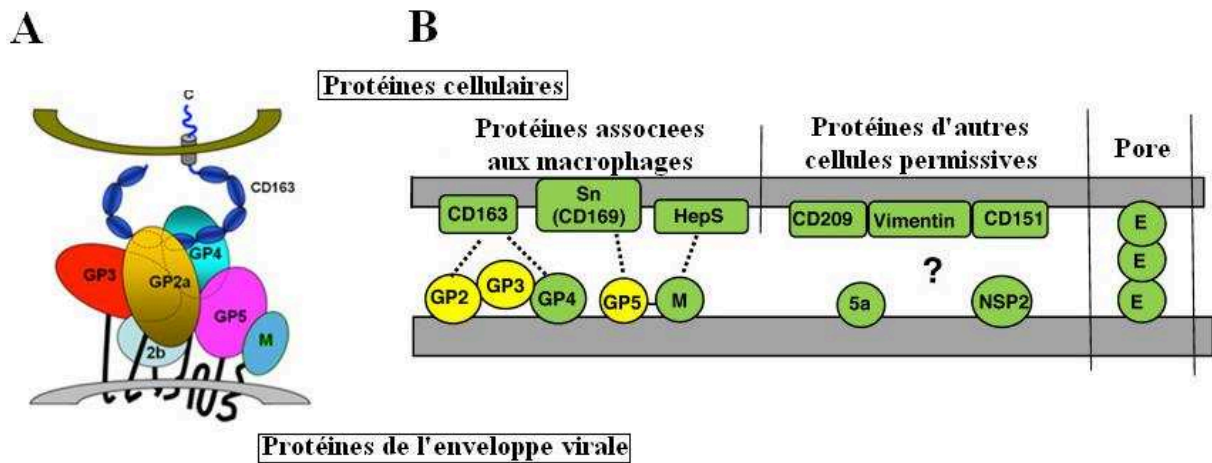


Figure 4 - Représentation schématique des interactions entre les protéines de l'enveloppe des PRRSV et les molécules de surface cellulaire

- A. Le complexe hétérodimérique GP2a-3-4-2b (GP2b aussi appelée E) et son interaction avec CD163 des cellules hôtes. Extrait de (Lunney et al. 2016, revue).
- B. Les interactions entre les protéines de l'enveloppe virale (ovales) et plusieurs récepteurs cellulaires (rectangles). Extrait de (Popescu et al. 2017, revue).

c. Les cellules cibles des PRRSV

Les PRRSV ont un tropisme pour les lignées cellulaires de type M θ . Les PAMs sont les principales cellules cibles. Les virus ont également été identifiés dans des M θ de différents tissus tels que les ganglions, le thymus, la rate, le placenta et l'utérus, le foie et les plaques de Peyers (Morgan et al. 2016). Par contre, les M θ péritonéaux et les monocytes du sang semblent réfractaires à l'infection (Teifke et al. 2001). In vitro, les macrophages dérivés des monocytes (Monocyte-derived Macrophages – MoM θ en anglais) peuvent être infectés par la souche Lena du génotype 1 sous-type3, particulièrement les MoM θ dérivés sous dexaméthasone et IL-10. (Singleton et al. 2016). Cette étude montre aussi que les MoM θ sont plus sensibles à l'infection par la souche Lena que les cellules dendritiques dérivées des monocytes (Monocyte-derived Dendritic Cells – MoDC en anglais) qui s'avèrent peu infectables (cf. partie III.B.1.a.ii.).

d. Cycle viral

Les PRRSV se répliquent dans le cytoplasme cellulaire des M0 et produisent généralement un effet cytopathique en 24 heures. Le cycle est détaillé dans la **Figure 5** ci-dessous.

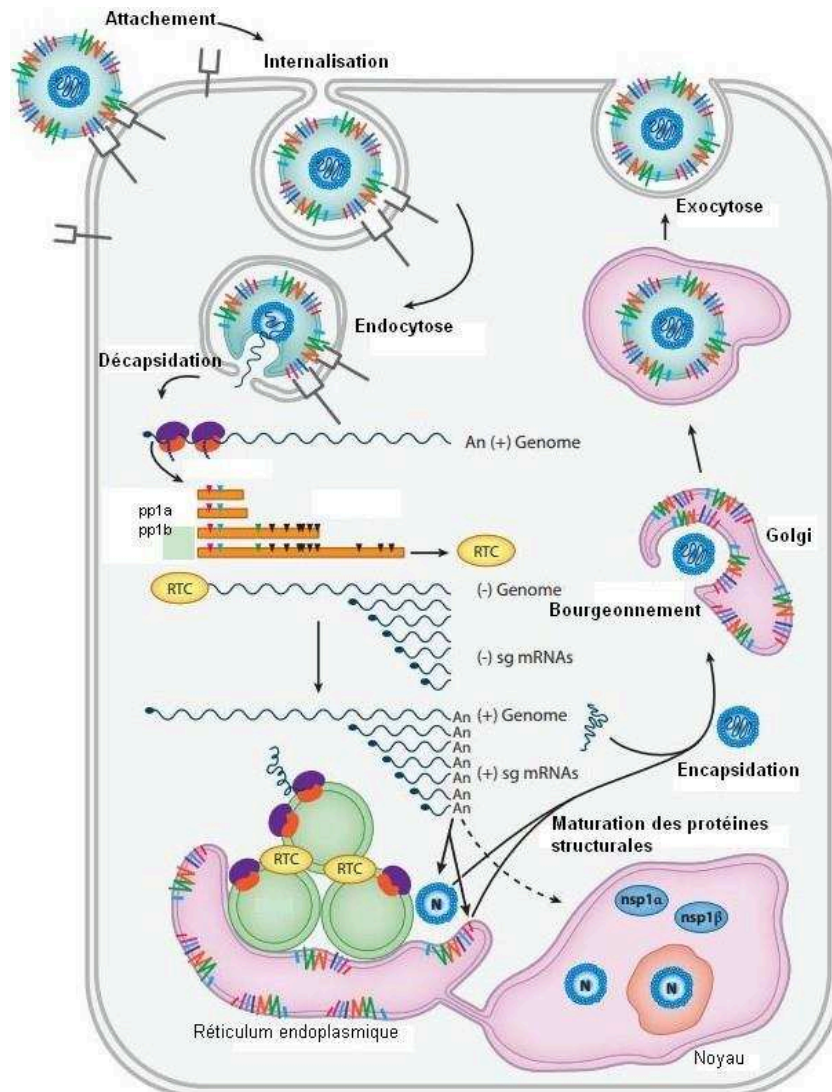


Figure 5 - Schéma du cycle de réplication des Arterivirus

L'attachement aux récepteurs cellulaires est suivi de l'entrée virale médiée par endocytose, puis décapsidation de la particule virale. Le génome est traduit directement en polyprotéines pp1a et pp1b. Ces polyprotéines sont maturées par succession de clivages par des protéinases internes (triangles roses, bleus, verts et noirs). Les protéines non structurales virales sont exprimées à partir de ces polyprotéines et elles sont assemblées en un complexe de réplication et de transcription (Replication and Transcription Complex – RTC en anglais). Le RTC débute la réplication virale avec la transcription du génome infectieux ARN(+) en brin complet complémentaire ARN(-) et des ARNm(-) subgénomiques (sg). Les brins complémentaires génomiques ARN(-) servent de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux ARN(+) infectieux. Les ARNm(-) sg servent de matrice pour la synthèse d'ARNm (+) sg codant les protéines structurales. Les génomes d'ARN(+) néoformés sont encapsidés pour former après bourgeonnement de nouvelles particules virales infectieuses.

Extrait de (Lunney et al. 2016, revue).

4. Symptômes chez le porc et co-infections

a. Transmission et symptomatologie

Les animaux de tous âges peuvent être atteints et devenir virémiques vingt-quatre heures après infection (**Artiriviruses, Virology 2013, livre**). Les symptômes dépendent de la virulence de la souche, la génétique des porcs, l'immunité pré-existence induite soit par une infection antérieure soit par une vaccination, et du statut sanitaire des troupeaux. Le virus induit un syndrome d'allure grippale qui se traduit par des troubles de la reproduction et respiratoires (**Butler et al. 2014**). Les truies exposées au virus peuvent transmettre l'infection aux fœtus via le placenta et avorter à différents stades de développement ou mettre bas des mort-nés ou des porcelets momifiés (**Figure 6**). D'autre part et plus particulièrement chez les porcs en début d'engraissement, les signes cliniques courant d'une infection aux PRRSV sont une fièvre (40 - 42°C), de l'anorexie, des difficultés respiratoires, des lésions pulmonaires et parfois des cyanoses des oreilles (**Figure 6**). Lors d'infections expérimentales chez le porcelet, le virus a été détecté dans un premier temps dans les amygdales puis dans les organes plus internes tels que les poumons principalement, le cœur, le foie, la rate et les reins. Lors d'infections naturelles chez des truies et porcelets, les sites principaux de production virale sont les amygdales, ce qui permet une bonne détection dans les fluides oraux (**Trang et al. 2014**). La mortalité suite à une infection par le PRRSV peut varier entre 20 à 100% selon l'âge des animaux et leur santé dans le cas de souche hautement pathogénique (**Virology 2013, livre**).

Dans les élevages porcins infectés, le virus peut être transmis de différentes manières : par voie aérienne ou placentaire, par contact avec des fluides (salive, semence, excrément, urine), par ingestion de matières contaminées, et même par inoculation parentérale (plaies cutanées, aiguilles contaminées, piqûres d'insecte) (**Wills et al. 2003**). Suite à une infection via les voies respiratoires, l'infection devient systémique au bout de quatre jours (**Loving et al. 2015, revue**). Il en résulte une virémie persistante de plusieurs mois avant que le porc ne réussisse à l'éliminer. Cette virémie peut durer 250 jours voire parfois 1 an (**Lunney et al. 2016, revue ; Wills et al. 2003**). Les organes qui s'avèrent être des réservoirs du virus sont les amygdales, les poumons et le thymus (**Morgan et al. 2016**).

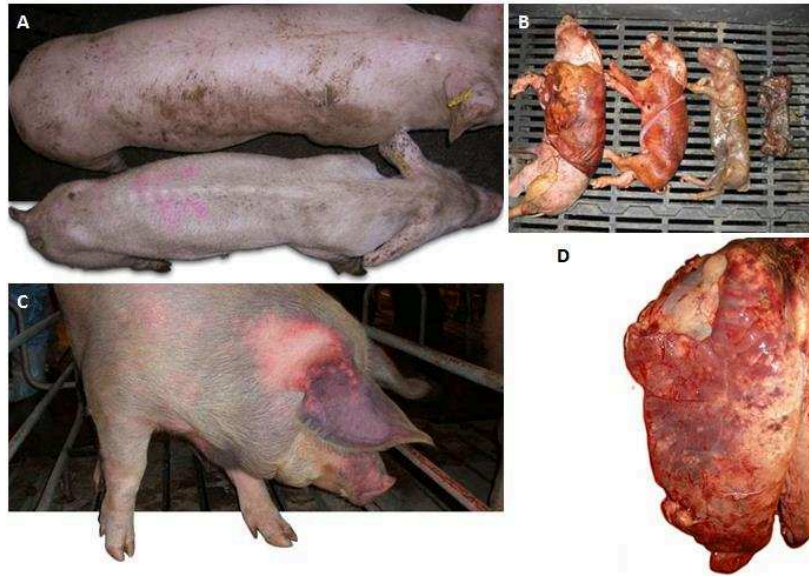


Figure 6 - Photographies de symptômes d'une infection par le PRRSV

- A. Anorexie (<https://www.pig333.com>)
- B. Morts fœtales à différents stades embryonnaires (<https://www.3tres3.com>)
- C. Cyanose des oreilles d'une truie (<https://www.3trois3.com>)
- D. Lésions pulmonaires d'un porc infecté âgé de 14 semaines (<https://www.pig333.com>)

b. Biosécurité

Comme décrit précédemment (cf. partie III.A.1.) le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin est une maladie économiquement importante. C'est pourquoi, la biosécurité est une des clefs pour la prévention (<http://www.prrs.com/en/prrs-control/biosecurity>).

À l'échelle de l'élevage, de multiples stratégies ont été testées : adaptation des truies de renouvellement, dépeuplement-repeuplement, vaccination massive, analyse et élimination, ou encore l'isolement de l'élevage. Toutefois, la réinfection par des souches émergentes est fréquente. Après avoir identifié les voies de transmission, il est possible d'adopter les bonnes pratiques pour éviter la propagation virale. En effet, les semences des porcs doivent être analysées ; le personnel prend des douches avant et après les contacts avec les animaux; les cottes, les bottes et les aiguilles doivent être changées, ou encore, les véhicules de transport des animaux doivent être lavés et désinfectés. Le risque de transmission par l'air (courte et longue distances) n'est pas négligeable et la filtration de l'air permet de diminuer ce risque. La vaccination des truies et des porcelets est la stratégie la plus communément utilisée pour contrôler la maladie. Il a été démontré qu'un vaccin atténué a induit une protection

hétérologue partielle avec une diminution de la virémie chez les porcs vaccinés et a réduit de dix fois le risque de transmission virale entre les porcs (**Rose et al. 2015**).

À l'échelle régionale, différents pays ont établi des programmes pour le contrôle/élimination des virus comme vingt-cinq régions d'Amérique du Nord, la Corée ou encore la Hollande. Le programme néerlandais consiste dans un premier temps à réduire la transmission virale entre les élevages (biosécurité externe) et dans les élevages (biosécurité interne) avec des mises en quarantaines des animaux potentiellement infectieux. Lorsque après trois analyses, les élevages sont négatifs aux PRRSV, les actions se focalisent sur la biosécurité externe afin d'empêcher de nouvelles infections et de maintenir le statut négatif. À la différence, si les élevages sont positifs aux PRRSV, les actions se focalisent sur la biosécurité interne.

À l'échelle nationale, la Hongrie a exigé en 2014 une réglementation stricte des importations de porcs reproducteurs ou d'engraissement avec une mise en quarantaine. Un protocole accorde le statut PRRSV aux porcs et aux élevages qui réalisent des analyses sérologiques fréquentes, amenant à l'éradication virale dans certaines régions hongroises.

c. Diagnostic de la maladie

Les signes cliniques observés font souvent suspecter à un PRRSV (**PRRSV, OIE**). Le diagnostic clinique doit être confirmé dans un premier par l'identification de la souche virale. Le diagnostic virologique des PRRSV est difficile. Le virus peut être isolé à partir de sérum ou bien d'échantillons pulmonaires, des amygdales, des ganglions ou encore de la rate. Leur tropisme cellulaire étant les macrophages, ces cellules sont recommandées pour l'isolation virale pour les PRRSV ou bien des macrophages dérivés des monocytes (**García-Nicolás et al. 2014**), ou encore sur des lignées cellulaires sensibles comme les cellules MARC-145, les cellules CL2621 (dérivées de cellules rénales de singe) (**Bautista et al. 1993**) ou les cellules SJPL (St-Jude Porcine Lung) (**Provost et al. 2012**).

La détection des ARN viraux dans les tissus ou dans le sérum est faite par RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction). Cette technique hautement spécifique est sensible et permet d'évaluer rapidement le statut de l'infection. Aucun unique essai de RT-PCR n'est capable de détecter toutes les souches de PRRSV en particulier dans les sous-types du PRRSV-1 qui sont très diversifiés. De ce fait, l'interprétation des résultats de RT-PCR

doivent être soigneusement évalués, et la validation doit être suivie d'un séquençage et d'une étude phylogénique des souches circulantes (**Wernike et al. 2012**).

Des tests sérologiques viennent compléter les tests virologiques. Différentes méthodes de détection d'anticorps dans les séras ont été décrites comme l'IPMA (ImmunoPeroxydase Monolayer Assay), l'IFA (ImmunoFluorescence Assay) ou l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). L'ELISA est la méthode la plus communément utilisée au vu de sa rapidité, sa spécificité et sa sensibilité de confirmation à l'exposition virale. Les kits commercialisés peuvent être utilisés dans les sécrétions nasales et les sérums. Ces kits utilisent des antigènes séparément ou combinés des PRRSV-1 et PRRSV-2. Les protéines nsp1, nsp2 et N peuvent être utilisées dans le développement d'ELISA. De nombreux ELISA expérimentaux ont été publiés comme un ELISA double-sandwich capable de distinguer les réponses humorales entre les deux génotypes viraux jusqu'à sept jours après infection (**Sørensen et al. 1998**). Ou encore, un double ELISA avec des N recombinantes a permis de détecter simultanément les anticorps spécifiques PRRSV-1 et PRRSV-2 avec une spécificité de 98,3 % et 99,3 % et une sensibilité de 97,4 % et 99,8 % respectivement (**Brown et al. 2009**).

d. Co-infections associées au PRRSV

Les PRRSV, en fonction des souches virales, de la génétique du porc, ou de l'âge, induiraient des altérations de réponses immunitaires favorisant la pathogénicité d'autres infections bactériennes ou virales. Ainsi, il est courant d'observer des co-infections avec les PRRSV. Dans des pneumonies associées à l'infection par un PRRSV sur le terrain, des co-infections ont fréquemment été détectées (**Fablet et al. 2012 ; prrs.com**). Différents pathogènes sont en cause aussi bien des bactéries telles que *Haemophilus parasuis*, *Salmonella*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* que d'autres virus du complexe respiratoire porcin tels que le Circovirus (Porcine Circovirus 2), le coronavirus respiratoire porcin et les virus influenza. Par exemple, une étude a montré que la co-infection des PRRSV et des virus influenza se traduit par des manifestations cliniques plus sévères que les deux infections indépendantes (fièvre et perte de poids) (**Van Reeth et al. 1996**). Bien que des travaux sur l'effet clinique des co-infections entre PRRSV et d'autres agents pathogènes conduisent à des résultats parfois contradictoires (**Renukaradhya et al. 2010 ; Pol et al. 1997**), l'existence de co-infections fréquentes sur le terrain indique qu'il est

nécessaire de développer des vaccins efficaces pour contrer ces co-infections. Dans le travail expérimental, ma première étude a concerné une stratégie vaccinale contre le virus influenza porcine que je vais rapidement présenter ici.

e. Les virus influenza porcins

Les virus de la grippe appartiennent au genre des Influenza A, B, C ou D, famille des Orthomyxoviridae. Tous ces virus ont un génome d'ARN à 8 segments linéaires simple brin de polarité négative. Ces virus sont enveloppés et comprennent 8 protéines structurales. L'hémagglutinine (HA) est constituée de HA1 qui est la portion globulaire en surface qui se fixe aux acides sialiques de l'hôte et de HA2 qui est la portion membranaire (tige) impliquée dans la fusion. La neuraminidase (NA) qui catalyse l'hydrolyse des acides sialiques et permet la libération du virus. Il existe deux protéines de matrice M1 et M2 : M2 forme un canal ionique permettant l'acidification de la vésicule d'endocytose, démasquant ainsi le peptide de fusion qui assure la sortie du virus dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il y a aussi une nucléoprotéine virale (NP) ainsi que les protéines du complexe polymérase PB1, PB2 et PA.

Les Influenza A ont une nomenclature qui dépend des propriétés antigéniques de deux protéines de surface HA et NA. À ce jour, dix-huit sous-types de HA (H1 à H18) et onze de NA (N1 à N11) ont été identifiés (**Sandbulte et al. 2015, revue**) ; ces différents sous-types peuvent infecter l'homme, le porc et les oiseaux. Les virus influenza, comme les PRRSV, sont génétiquement très instables. Ils subissent des modifications génétiques de deux types : 1) des glissements antigéniques liés à des mutations ponctuelles et 2) des cassures antigéniques liées à des réassortiments entre segments viraux. Les gènes de ces huit segments d'ARN peuvent recombiner et s'assembler entre les différents sérotypes viraux pour former un nouveau type de virus (**Sandbulte et al. 2015, revue**). Les protéines HA1 et NA sont les plus variables. La population humaine ou animale nouvellement infectée est alors immunologiquement naïve aux nouveaux antigènes de surface. C'est l'émergence d'un nouveau virus au sein d'une population naïve qui est responsable des pandémies grippales. Dans le cas de la pandémie de 2009, une co-infection du porc par un virus aviaire et un virus humain aurait conduit au H1N1 car des gènes provenant des trois espèces ont été retrouvés dans le virus. Ce virus H1N1 pandémique a été responsable de pathologies respiratoires aiguës et de syndromes grippaux classiques, en fonction de l'âge des individus. Le porc est sensible aux différents Influenza A dont le H1N1 2009. Il peut être infecté par les virus aviaires, humains et porcins et représenterait un hôte de mixage (mixing vessel - en anglais). Ainsi les éleveurs peuvent transmettre le virus humain aux porcs et inversement. Des souches influenza se sont

particulièrement adaptées au porc dans les sous-types H1N1, H1N2 and H3N2. Le porc exprime des symptômes semblables à ceux retrouvés chez l'homme.

Les vaccins utilisés actuellement en élevage porcin sont des vaccins inactivés et adjuvés, qui induisent des réponses principalement contre HA1 (portion globulaire de HA) et NA (Sandbulte et al. 2015, revue). Comme pour les PRRSV, ces vaccins ne sont pas efficaces contre des nouvelles souches émergentes, générées en raison de l'instabilité génétique virale. La protéine NP, la portion extracellulaire du canal ionique M2e et HA2 sont conservées entre isolats et sont des cibles antigéniques particulièrement intéressantes pour développer des vaccins dits "universels", i.e. inducteurs d'immunité protectrices inter-souches (Zhang et al. 2015). De tels vaccins permettraient non seulement de protéger les porcs mais également la transmission entre espèces.

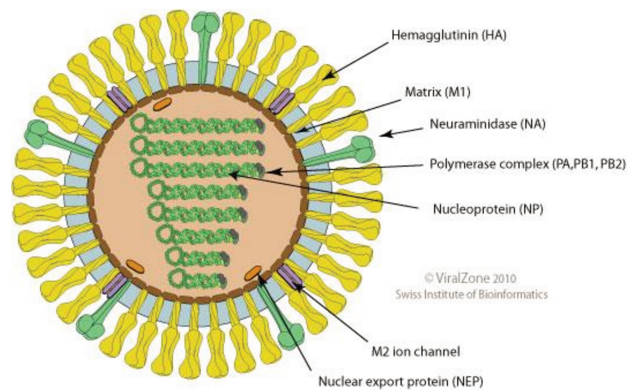


Figure 7 - Représentation schématique d'une particule virale influenza A

L'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA) et les protéines M2 constituent l'enveloppe virale. L'HA est trouvée sous forme d'un trimère, et NA et M2 sont sous forme de tétramères. La protéine de matrice M1 est à la base de l'enveloppe lipidique virale. Les protéines NEP sont impliquées dans l'exportation nucléaire. Le génome viral est constitué de huit segments d'ARN simple brin de polarité négative encapsidés chacun par des nucléoprotéines (NP). Le complexe polymérase viral rattaché aux segments génomiques viraux est constitué des protéines PA, PB1 et PB2.

B. Les réponses immunitaires contre les PRRSV

1. Immunité innée contre les PRRSV

La réponse innée du système immunitaire est la première ligne de défense contre les infections. Cette immunité agit de manière immédiate par l'action de cellules d'origine hématopoïétique telles que les granulocytes, les phagocytes mononucléés et les cellules Natural Killer (NK). Ces cellules vont rapidement produire différentes chimiokines et

cytokines inflammatoires (IFN-I, TNF α , IL-1, IL-6, IL-8). Certains de ces médiateurs inflammatoires ont une action antivirale directe comme l'IFN-I (IFN α et IFN β). Le niveau de production des cytokines inflammatoires est nettement plus faible chez les porcs infectés par les PRRSV en général que par d'autres virus (**Lunney et al. 2016, revue**). En effet, une infection par le PRRSV induit une production d'IFN α cent fois moins importante que lors d'une infection par le Swine Influenza Virus (SIV) ou bien le Porcine Respiratory Coronavirus (PRCV) et l'infection par le PRRSV ne semble pas induire de TNF α (**Reeth and Nauwynck, 2000**). Ainsi, les PRRSV ont développé différents mécanismes d'échappement au système immunitaire inné de l'hôte, et plus particulièrement à l'IFN-I.

a. Les phagocytes mononucléés chez les mammifères et en particulier chez le porc

Je vais développer ce paragraphe sur les phagocytes mononucléés en raison de leur importance dans la réponse anti-virale et aussi vaccinale, qui fera l'objet de mes travaux. Les phagocytes mononucléés comprennent les monocytes, M θ et cellules dendritiques. Il existe différentes possibilités de classer les phagocytes mononucléés sur la base de leur morphologie, l'expression de marqueurs de surface et les spécialisations fonctionnelles. Dans ma thèse, je m'appuie sur le système de classification de **Guilliams and Van de Laar (Figure 8)** qui est basé sur l'ontogénie de ces cellules, établie dans le modèle de référence murin. Deux grandes classes de populations cellulaires se distinguent sur la base de l'ontogénie : 1) les M θ issus de précurseurs embryonnaires et 2) les cellules issues de précurseurs de la moëlle osseuse qui comprennent d'une part les monocytes et les cellules dérivées des monocytes (MoM θ et MoDC) et d'autres part les cellules dendritiques bona fide. Ces populations ont été décrites principalement chez la souris et l'homme. Toutefois, plusieurs équipes dont mon équipe Vaccin Virus et Immunité (V2I) de l'INRA de Jouy-en-Josas ont identifié des populations homologues chez les ruminants et le porc (**Vu Manh et al. 2015a**). Dans ce qui suit, je vais présenter les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles majeures de ces sous-populations cellulaires dans différents tissus sur la base des connaissances acquises le plus souvent chez la souris, et préciser les caractéristiques des cellules homologues porcines, quand elles sont connues. Concernant l'expression des marqueurs de surface, je vais employer l'annotation descriptive suivante fonction du niveau d'expression: négatif (neg), faible (low – en anglais), intermédiaire (int) ou élevé (high – en anglais). Les données des trois paragraphes

ci-dessous sont pour la plupart issues de deux revues: (**Guilliams and Van de Laar, 2015, Guilliams et al. 2014, revue**). L'expression des marqueurs permettant d'identifier les sous-populations de phagocytes mononucléés est le plus souvent spécifique à une espèce, mais il existe des phénotypes communs à plusieurs espèces voire à toutes les espèces de mammifères étudiées (**Tableau 1**).

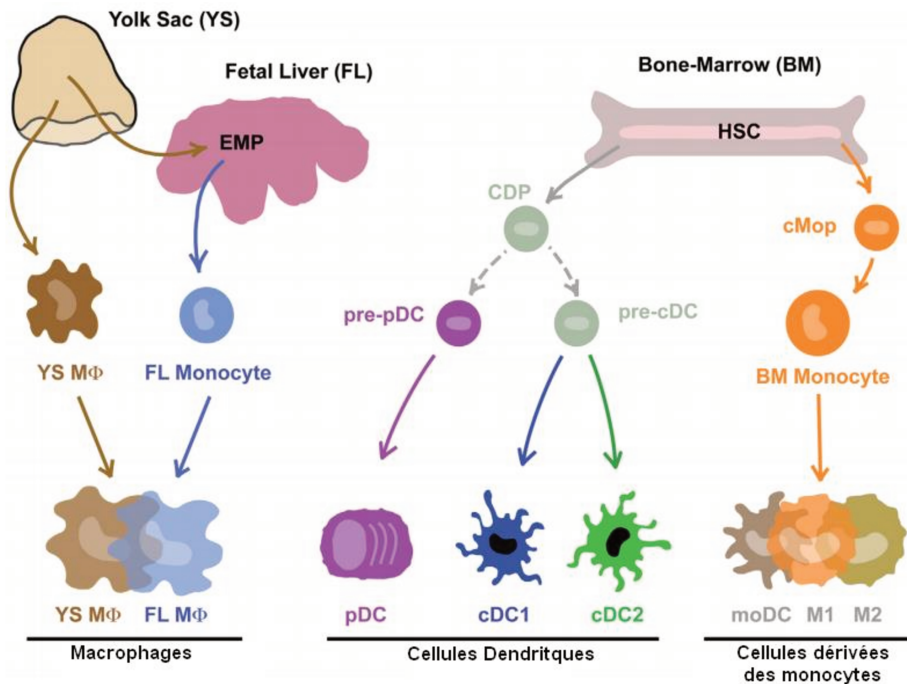


Figure 8 - Modèle de classification des phagocytes mononucléés et leurs précurseurs

Extrait de (**Guilliams and Van de Laar, 2015**).

i. **Macrophages (M θ) issus de précurseurs embryonnaires**

Les M θ embryonnaires proviennent du sac vitellin ou des monocytes du foie fœtal et colonisent certains tissus où ils s'auto-renouvellent toute la vie de l'individu. Ces M θ sont connus sous les noms de cellules Kupffer, les cellules microgliales cérébrales, les PAMs et les cellules de Langerhans. Les M θ sont des cellules à cytoplasme vacuolaire, spécialisées dans la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques et des pathogènes. Elles sont impliquées dans la réparation tissulaire et présentent des fonctions immunomodulatrices. Les cellules de Langerhans qui sont des M θ sur le plan ontogénique, sont localisées dans l'épiderme et se rapprochent fonctionnellement des cellules dendritiques car elles sont capables de présentation antigénique et font partie des cellules présentatrices d'antigènes (Antigen Presenting Cells - APC en anglais). Chez le porc, les cellules de Langerhans de la

peau et les PAMs ont été caractérisés pour leur phénotype par l'équipe V2I. Comme la plupart des sous-populations de phagocytes mononucléés étudiées dans plusieurs espèces, leur caractérisation phénotypique utilise les molécules de surface du lignage myéloïde SIRP α et CD163 (qui est aussi le récepteur au PRRSV). Chez le porc, les cellules de Langerhans sont CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) class II^{pos} Langerin^{pos} SIRP α ^{high} CD163^{neg} (Marquet et al. 2011) et les PAMs sont CMH class II^{pos} SIRP α ^{high} CD163^{high} (Maisonasse et al. 2016). Chez le porc, notre équipe a montré que des M θ partageant un phénotype identique avec celui des PAMs sont retrouvés dans la lumière des vaisseaux sanguins pulmonaires et sont capables de phagocyter des bactéries systémiques (Bordet et al. 2018).

ii. Les monocytes et cellules dérivées des monocytes

Les monocytes sont des cellules très plastiques qui circulent dans le sang et se retrouvent également dans certains tissus à l'état basal (peau, poumon) et lors d'inflammation. Chez la souris, il faut distinguer les monocytes classiques CCR2^{pos} (LY6C^{high}) et les monocytes non classiques CX3CR1^{high} (LY6C^{low}). Les monocytes non classiques patrouillent la paroi interne des vaisseaux sanguins chez la souris. Les monocytes classiques se différencient en M θ dans la peau et l'intestin à l'état basal. Lors l'inflammation, ils sont fortement recrutés dans les tissus et se différencient, en fonction des stimuli en MoM θ , en MoDC ou aussi en cellules suppressives appelées Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC). Les MoM θ partagent donc des propriétés phénotypiques et fonctionnelles avec les M θ embryonnaires (phagocytose, réparation) et les MoDC avec les DC conventionnelles (présentation antigénique). Lors d'inflammation, les cellules dérivées des monocytes adoptent des profils phénotypiques très hétérogènes qui rendent leur caractérisation difficile et pour l'instant imprécise, générant parfois de la confusion car elles ressemblent à d'autres cellules: les MoDC ressemblent aux cDC2 (cf. partie III.B.1.a.ii. et iii.) et les MoM θ aux M θ embryonnaires. Toutefois, les MoDC sont en général de plus faibles APC que les cDC2 et elles migrent moins efficacement vers les ganglions. Chez le porc, les MoM θ de la peau à l'état basal ont été identifiées par l'équipe V2I comme étant CMH class II^{pos} SIRP α ^{pos} CD163^{high} (Marquet et al. 2014 ; Marquet et al. 2011) et ils partagent leur profil transcriptomique avec celui des DC CD14^{pos} de la peau humaine, cellules particulièrement efficaces pour induire des T helper folliculaires et la réponse anticorps chez l'homme (Marquet et al. 2011). Dans le poumon de porc, les MoM θ sont CMH class II^{pos} SIRP α ^{pos} CD163^{int} et les MoDC sont CMH class II^{pos} SIRP α ^{pos} CD163^{low}

(Maisonasse et al. 2016). Dans cet organe chez le porc lors d'infection par influenza, les MoDC sont fortement recrutées (Maisonasse et al. 2016).

iii. Cellules dendritiques (DC) bona fide

Espèces	Phénotype spécifique	Phénotype trans-espèces	Fonctions dominantes
pDC			
Souris	SiglecH ^{pos} BST2 ^{pos}	TLR7 ^{hi} TLR9 ^{hi}	Productions d'IFN α/β induites par les ligands de TLR7/9 et virus
Homme	CD123 ^{pos}		
Porc	CD4 ^{hi} SIRP α ^{int}		
cDC1			
Souris	CD8 α ^{pos} CD103 ^{pos}	SIRPα^{low} CADM1^{high} XCR1^{pos} CD13	Cross-présentation aux cellules T CD8 ^{pos} Orientation réponse Th1 IL-12p70
Homme	CD141 ^{pos/hi}		
Porc	CADM1 ^{pos/hi}		
cDC2			
Souris	CD4 ^{pos} CD11b ^{pos}	SIRP α ^{pos} CADM1 ^{low}	Présentation des antigènes aux cellules T CD4 ^{pos} Orientation réponses Th2 et Th17
Homme	CD1c ^{pos}		
Porc	CD1		

Table 1 - Comparaisons des phénotypes des différentes sous-populations de cellules dendritiques trans-espèces

Ce tableau résume les phénotypes membranaires spécifiques aux espèces, les phénotypes conservés entre ces espèces ainsi que les fonctions associées à la sous-population cellulaire. Extrait de (Dutertre et al. 2014, revue).

Les cellules dendritiques bona fide (Dendritic Cells – DC en anglais) sont issues d'un précurseur médullaire commun (Common DC Progenitor - CDP en anglais) (d'après **Guilliams and Van de Laar, 2015, Figure 8**). Ce CDP se différencie en DC plasmacytoïdes (Plasmacytoid Dendritic Cell – pDC en anglais) et en DC conventionnelles (conventionnal Dendritic Cell – cDC en anglais) de deux types, les cDC1 et cDC2. Le développement de ces trois catégories de DC dépend du facteur de croissance FLT3L et chaque catégorie se développe sous le contrôle de l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques.

Les pDC sont localisées dans le sang, les organes lymphoïdes et certains tissus (foie, poumon, intestin mais pas dans la peau à l'état basal). Des travaux récents indiquent que des pDC peuvent être issues de progéniteurs lymphoïdes IL-7R^{pos} en plus des CDP (**Rodrigues et al. 2018**). Leur développement dépend du facteur de transcription IRF8 et leur identité peut se faire sur l'hyper-expression du facteur de transcription TCF4 (**Rodrigues et al. 2018**). Les pDC jouent un rôle essentiel dans la réponse antivirale et aussi dans la tolérance à l'état basal.

Ce sont de grandes productrices d'IFN-I par la voie des ligands de récepteurs toll-like 7 et 9 (Toll-Like Receptor – TLR en anglais) (**Tableau 1**). Les pDC porcines sanguines sont définies comme étant SIRP α ^{low} CD4^{high} (**Dutertre et al. 2014, revue**).

Les cDC sont localisées dans les tissus lymphoïdes tels que la rate ou les ganglions et, les tissus non lymphoïdes tels que la peau, l'intestin, les poumons (**Dutertre et al. 2014, revue**). Dans toutes les espèces connues à ce jour, elles sont CMH class II^{high} CD11c^{high}. Les cDC sont subdivisées en deux populations : les cDC1 et les cDC2 qui se distinguent par leur développement, leur profil transcriptomique et leurs spécialisations fonctionnelles.

Le développement des cDC1 est sous contrôles des facteurs de transcription BATF3, ID2, NFIL3 et IRF8. Dans toutes les espèces étudiées, elles sont CADM1^{high} SIRP α ^{low} et elles expriment fortement et spécifiquement XCR1 (**Vu Manh et al. 2015b ; Dutertre et al. 2014, revue ; Bachem et al. 2010**). Ainsi, il s'agit de cellules DC XCR1^{pos}. XCR1 est le récepteur de la chimiokine XCL1, produite par les cellules T CD8^{pos} et les NK durant les infections et les réponses inflammatoires, et dont l'expression est impliquée dans l'induction des réponses T CD8^{pos} (**Kroczeck and Henn 2012, revue**). XCR1, de par sa conservation d'expression inter-espèces sur les cDC1, est une cible de choix pour le ciblage des antigènes vaccinaux sur les cDC1 (cf. partie III.D.2.c.). Les cDC1 sont impliquées dans l'induction des réponses T CD8^{pos} notamment par leur capacité à cross-présenter efficacement les antigènes, dans l'induction de la réponse Th1 et dans la sécrétion d'IL-12p70 et de IFN λ en réponse à la stimulation du TLR3 (**Dutertre et al. 2014, revue ; Bachem et al. 2010**). Chez le porc, les cDC1 ont été identifiées initialement par l'équipe V2I en utilisant la transcriptomique comparée dans le sang (**Vu Manh et al. 2015b**), la peau (**Marquet et al. 2011**) et le poumon (**Maisonnasse et al. 2016**). Les cDC1 capturent des corps apoptotiques à l'état basal (**Marquet et al. 2011**) et produisent particulièrement de l'IL-12 (**Maisonnasse et al. 2016**).

Le développement des cDC2 est sous contrôle des facteurs de transcription IRF4, RELB et RBpj et elles comprennent deux sous-populations, KLF4^{pos} and Notch2^{pos}. La population de cDC2 KLF4^{pos} est spécialisée dans l'induction de réponses de type T helper 2 (allergie, **Tussiwand et al. 2015**) alors que la population cDC2 Notch2^{pos} est spécialisée dans l'induction de réponses de type T helper 17 (**Satpathy et al. 2013**). Les cDC2 partagent des fonctions et des marqueurs avec les MoDC. Il est donc parfois difficile de les distinguer. Dans toutes les espèces, les cDC2 se distinguent des cDC1 par le phénotype CADM1^{low} SIRP α ^{high} (**Dutertre et al. 2014, revue**). Chez le porc, les cDC2 sont également CD1^{pos}, ce qui a aidé à les identifier dans le sang (**Edwards et al. 2017**), la peau où elles sont CD163^{low} (**Marquet et**

al. 2011) et le poumon où elles sont CD163^{neg} (Maisonasse et al. 2016). Les cDC2 des poumons de porc stimulent particulièrement efficacement les lymphocytes T CD4^{pos} à produire de l'IL-17 (Maisonasse et al. 2016).

b. Les lymphocytes Natural Killer (NK)

Les cellules NK représentent une première ligne de défense antivirale, de par leurs actions cytotoxiques et sécrétrices de cytokines anti-virales (IFN γ notamment). Chez des porcs infectés par un PRRSV-2, l'activité cytotoxique des NK s'est révélée significativement réduite dès deux jours post-infection, sans qu'il y ait de changement de leur représentation dans le sang (Renukaradhya et al. 2010). Cette activité est réduite davantage lors d'une co-infection avec le coronavirus porcin (Renukaradhya et al. 2010) et elle est retrouvée avec des vaccins atténués (Dwivedi et al. 2011).

c. Les mécanismes d'échappement à la réponse innée

Les PRRSV expriment plusieurs protéines virales non structurales impliquées dans l'échappement à la réponse innée, qui peuvent expliquer la faible expression des cytokines inflammatoires et d'IFN-I chez les porcs infectés. Deux revues décrivent leur implication qui est résumée ci-dessous (Lyo 2015, revue ; Rascón-Castelo et al. 2015, revue).

L'interférence de nsp1 sur la réponse innée et en particulier la réponse IFN-I a été détaillée plus haut (partie I.B.2.a.). La protéine nsp2, qui est très variable entre isolats, est également un inhibiteur de la production d'IFN-I en bloquant l'ubiquitination du *retinoic acid-inducible gene 1-a* (RIG-I) et en inhibant la phosphorylation d'IRF3. Nsp2 bloque également la réponse anti-virale en inhibant l'ISGylation de ISG15. Nsp2 affecte aussi les réponses TNF α et IL1- β . Nsp4 inhibe l'activation du promoteur du gène IFN γ en interférant sur l'activation de la voie NF κ B en ciblant le NF κ B essential modulator (NEMO). Enfin, nsp11 inhibe également l'activation du promoteur IFN γ . Cette faiblesse de la réponse innée est à mettre en rapport avec les particularités et les défauts de la réponse adaptative qui sont présentés ensuite.

2. Immunité adaptative contre les PRRSV

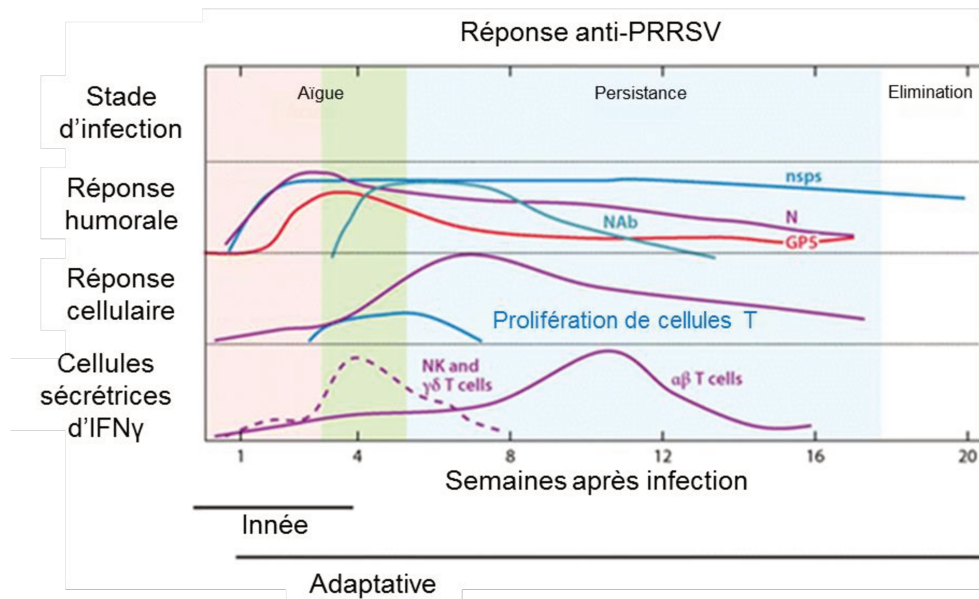


Figure 9 - Représentation des réponses immunes induites chez le porc lors d'une infection par les PRRSV

Les temps estimés sont approximatifs et ils sont dépendants de la souche virale.

La réponse humorale comprend: les anticorps non-neutralisants dirigés contre les protéines N en violet, GP5 en rouge, les protéines virales non structurales (non-structural proteins - nsps en anglais) en bleu et les anticorps neutralisants (Neutralizing Antibodies - NAb en anglais) en turquoise. La réponse cellulaire est tardive et elle comprend des cellules productrices d'IFN γ impliquant des cellules Natural Killer (NK) et les cellules T $\gamma\delta$ puis, plus tard dans l'infection, des cellules T $\alpha\beta$.

Extrait de **Lunney et al. 2016, revue**

Les Porarterivirus causent des infections persistantes au dépend de la réponse adaptative. Quelques revues ont regroupé les informations disponibles de l'immunité chez les porcs contre les PRRSV (**Rahe and Murtaugh 2017a, revue ; Lunney et al. 2016, revue ; Loving et al. 2015, revue ; Mateu and Diaz 2008, revue**).

a. Les réponses humorales

La réponse humorale implique des anticorps ou immunoglobulines capables d'engager différents mécanismes effecteurs anti-viraux. Dans le cas d'infection par les PRRSV, les anticorps non-neutralisants (non-Neutralizing Antibodies - non-NAbs en anglais) sont produits en premiers suivis des anticorps neutralisants (Neutralizing Antibodies – NABs en anglais).

i. Les anticorps non-neutralisants (non-NAbs)

Rapidement après infection, les premiers anticorps spécifiques des PRRSV sont sécrétés. Ces anticorps qui apparaissent précocement durant l'infection virale ont été démontrés comme non-neutralisants *in vitro* (Yoon et al. 1994). Les cibles prédominantes des non-NAbs sont les protéines structurales N, M et GP5 (détaillées plus haut) ainsi que des nsp telles que nsp1, nsp2 et nsp7 (Rahe and Murtaugh 2017b).

Dans les fluides oraux et les sérums des porcs infectés, les différents isotypes d'immunoglobulines (Ig) sont détectés à différents temps après l'infection (days post infection – dpi en anglais). Des IgM sont détectés dès 7 dpi avec un pic de détection entre 14 et 21 dpi avant de décroître puis ils deviennent indétectables vers 40 dpi (Loving et al. 2015, revue). Des IgA sont détectés vers 7 dpi (Rotolo et al. 2018). Les isotypes IgG sont détectés vers 9 - 10 dpi avec un pic de sécrétion entre 21 et 28 dpi (Rotolo et al. 2018). Toutefois, le taux d'IgG spécifiques reste élevé et inchangé 6 à 9 semaines après l'infection (Loemba et al. 1996).

Les IgG sont dirigés chronologiquement contre les protéines structurales virales N, M puis GP5 (Loving et al. 2015, revue). Les kits de diagnostic commercialisés sont des ELISA indirects. L'antigène de revêtement principalement utilisé dans ces kits est une forme recombinante de la nucléoprotéine des deux génotypes viraux. Il existe des kits avec un revêtement issu d'un extrait riche en glycoprotéines du génotype 1 (Biernacka et al. 2018). Les protéines non structurales sont aussi cibles des non-NAbs. Une séquence protéique de nsp1 a été identifiée comme conservée entre les souches PRRSV-2 (Song et al. 2012). Nsp2 a été démontrée comme étant une protéine hautement immunogénique. Comparée aux autres nsp, elle contient un épitope immunodominant hypervariable (de Lima et al. 2006). Nsp7 est relativement conservée entre les souches avec une homologie de séquence en acide aminé entre 96,7 % et 97,4 % pour PRRSV-1, 84,9 % jusqu'à 100 % pour PRRSV-2, mais seulement une identité de 45 % entre les PRRSV-1 et les PRRSV-2 (Wang et al. 2017). Elle a été démontrée comme immunoréactive, pouvant être un candidat de coating pour les kits de diagnostic, et elle pourrait être intéressante pour développer des tests ELISA DIVA (Differentiating Infected versus Vaccinated Animals en anglais). Cette région homologue entre PRRSV-1 contiendrait un épitope immunodominant induisant une forte réponse anticorps (Wang et al. 2017 ; Brown et al. 2009).

Certains épitopes présents dans N et GP5 ont été proposés comme étant impliqués dans la facilitation de l'infection par les non-NAbs (Antibody-Dependent Enhancement – ADE en

anglais). Plusieurs études suggèrent l'existence du phénomène d'ADE lors d'infection par les PRRSV mais cela reste controversé. Supportant son existence, il a été démontré *in vitro* que l'expression de CD16 (récepteur FcγR) à la surface des cellules initialement non permissives aux PRRSV rend ces cellules sensibles à l'infection et les conduits à produire des virions fonctionnels (**Gu et al. 2015**).

Enfin, il semble que les mécanismes d'ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) et d'ADCDC (Antibody Dependent Complement-mediated Cytotoxicity) ne puissent pas être impliqués dans l'immunité anti-PRRSV car les protéines PRRSV ne sont pas détectées à la surface des Mθ (**Coster et al. 2006**). Toutefois, il faudrait investiguer de plus près ces mécanismes d'ADCC et d'ADCDC, qui sont reconnus difficiles à aborder sur le plan technique.

ii. Les anticorps neutralisants (NAbs)

La production d'anticorps neutralisants est faible et apparaît tardivement vers 28 dpi et elle est rarement détectée avant (**Darwich et al. 2011**). Leur mécanisme d'action repose principalement sur le blocage des interactions entre les virus et les récepteurs présents à la surface des Mθ (**Delputte et al. 2004**). Les cibles prédominantes des NAbs sont les protéines virales impliquées dans les interactions virus-cellules cibles : GP2, GP3, GP4, GP5 et M (**Darwich et al. 2011**). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le retard de la mise en place de la réponse humorale neutralisante. GP5 est constituée de plusieurs sites N-glycosylés (résidus 37 – 45 aa) au niveau ou à proximité de son épitope neutralisant immunodominant (**Roques et al. 2013**). Le nombre de N-glycosylation bloquerait l'accès des anticorps à cet épitope. De plus, GP5 possède un épitope appât (résidus 27 – 30 aa) qui détourne la réponse anti-épitope neutralisant (**Ostrowski et al. 2002**). La faible sécrétion de cytokines stimulatrices par les cellules présentatrices d'antigènes est une autre hypothèse émise.

Dès le début des années 1990, des études de transferts passifs ont permis d'associer la capacité des NAbs (analysés *in vitro*) à protéger les animaux *in vivo*. Les NAbs induisent une protection efficace contre les souches homologues lors de transfert (**Rahe and Murtaugh 2017b**). Par contre, leur efficacité est moindre contre des souches hétérologues et la cross-protection dépend du titre de NAbs et de la souche virale étudiée (**Lopez et al. 2007**). La variabilité génétique des PRRSV a amené les laboratoires à rechercher l'existence d'anticorps

cross-neutralisants. La mise en évidence de la cross-neutralisation in vitro a été réalisée et elle dépend de l'âge des individus, de leur génétique, des expositions virales précédentes et des élevages (**Robinson et al. 2018**). Pour montrer le rôle cross-protecteur, des immunoglobulines ont été purifiées à partir de truies d'élevages infectés à répétition par des PRRSV-2. Les immunoglobulines ayant une activité cross-neutralisante in vitro ont montré, après transfert passif, une activité protectrice de 96% contre une épreuve PRRSV-2 et de 87% contre une épreuve avec un PRRSV-1; par contre des immunoglobulines non neutralisantes d'une truie pourtant séropositive étaient sans effet protecteur. Toutefois le (les) déterminant(s) antigénique(s) impliqué(s) dans la cross-neutralisation n'a (ont) pas pu être déterminé(s) dans cette étude (**Robinson et al. 2018**). La conformation de l'hétérodimère de GP5-M comprend des épitopes reconnus par les anticorps cross-neutralisants. La suppression de l'acide aminé Tyr-10 de M change cette conformation et empêche la cross-neutralisation sans affecter la neutralisation homologue (**Trible et al. 2015**).

b. La réponse lymphocytaire T (ou réponse cellulaire T)

La réponse lymphocytaire T contre les infections des Arterivirus n'est pas bien caractérisée (**Snijder and Kikkert, Arteriviruses, Virology 2013, livre**). Elle se met tardivement en place. Elle est détectée à partir de 2 – 3 semaines post-infection (**Figure 9**). Par rapport à d'autres virus communs porcins tels que Pseudorabies virus, la réponse lymphocytaire induite après une infection ou une vaccination est trois à quatre fois plus faible (**Darwich et al. 2011**). La technique la plus répandue chez le porc pour mesurer la réponse lymphocytaire T est l'ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSPOT) et plus particulièrement l'ELISPOT IFN γ (**Darwich et al. 2011**).

i. Implication des cellules T CD4^{pos}, CD8^{pos} et CD4^{pos}/CD8^{pos}

Bien que les NAb soient impliqués dans la protection anti-virale, des porcs infectés peuvent être capables de contrôler l'infection en absence de ces NAb (**Rahe and Murtaugh, 2017b**). Les lymphocytes T CD8 β ^{pos} (phénotype des lymphocytes T CD8^{pos} cytotoxiques chez le porc), les lymphocytes T CD4^{pos} et les doubles positives (phénotype des lymphocytes T CD4^{pos} mémoires chez le porc) n'ont pas été montrés directement impliqués mais plusieurs observations suggèrent leur rôle dans le contrôle viral (**Darwich et al. 2011**). En effet, une protection contre un challenge hétérologue PRRSV-2 a été obtenue chez des porcs infectés

expérimentalement avec un vaccin atténué commercial PRRSV-1 ; cette protection a été associée à un faible titre en NAbs et à une réponse CD4^{pos} CD8^{pos} IFN γ ^{pos} robuste après challenge hétérologue (**Park et al. 2014**). Une autre étude a comparé le niveau de la réponse lymphocytaire T induite chez des porcs infectés par différentes souches PRRSV-1 (**Salguero et al. 2015**): l'expression d'IFN γ s'est révélée élevée chez les porcs infectés par la souche SU1-Bel (sous-type 3) ou par la souche Belgium A (sous-type 1) et était inversement corrélée à la charge virale. Dans cette même étude, les souches Lelystad (sous-type 1) et la souche 215-06 (sous-type 1), peu pathogènes, ont induit une faible réponse lymphocytaire T IFN γ chez les porcs infectés. Ces résultats suggèrent l'implication des lymphocytes T dans la protection virale, et indiquent que cette réponse lymphocytaire dépend aussi de la souche virale. Enfin, une autre étude a montré une augmentation du facteur spécifique de la réponse Th1 Tbx21 (T-bet) dans les cellules CD4^{pos} in vivo, chez des porcs infectés expérimentalement. (**Ebner et al. 2014**). Dans la littérature, des conclusions opposées entre les études ne permettent pas de déterminer clairement l'implication des cellules CD8^{pos} cytotoxiques (Cytotoxic T Lymphocyte – CTL en anglais). En effet, la déplétion temporaire des cellules CD8^{pos} au moment d'une infection n'entraîne pas l'augmentation de l'infection. Ces résultats suggèrent que les CTL n'auraient pas de rôle fonctionnel dans le contrôle de l'infection dans la phase aiguë mais il est difficile de contrôler leur déplétion totale, notamment dans les organes (**LohseDr and Eriksen, 2004**). Une étude a essayé d'évaluer la corrélation entre la persistance virale et les cellules cytotoxiques du sang et des organes lymphoïdes chez les porcs infectés (**Lamontagne et al. 2003**). Une diminution des cellules CD2^{pos} CD8^{high} dans les amygdales pourrait favoriser la persistance virale dans ces organes, alors que l'augmentation de ces cellules dans le sang contrôlerait la charge circulante.

Au cours de l'infection, les différents types de lymphocytes T sont détectés à différents temps. Les cellules CD4^{pos} diminuent transitoirement dans le sang vers 3 – 7 dpi avant de revenir à la normale vers 7 – 14 dpi. Dès 14 dpi, les lymphocytes T mémoires prolifèrent sans avoir d'activité cytotoxique. Plus tardivement, une augmentation des cellules CD8^{pos} est observée vers 28 – 35 dpi. Les cellules CD8^{pos} à activité cytotoxique sont détectées environ vers 49 dpi (**Loving et al. 2015, revue**). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la mise en place tardive de la réponse lymphocytaire. Comme d'autres virus de familles différentes (le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) un Retroviridae, la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) un Flaviviridae, l'Artérite Virale Equine (EAV) un autre Arterividae), les cellules myéloïdes sont les cibles principales des PRRSV qui pourraient altérer ainsi leur

fonction présentatrice d'antigènes. Cette caractéristique pourrait expliquer la faible réponse immunitaire mise en place et qui peut en partie expliquer sa capacité de persister dans des organes différents (Salquero et al. 2015).

ii. Régions antigéniques ou épitopes T

La connaissance des cibles antigéniques de la réponse lymphocytaire T est nécessaire pour aiguiller sur les candidats antigéniques dans le développement de vaccin. Pour analyser les antigènes spécifiques de la réponse lymphocytaire T et permettre d'assigner un phénotype aux cellules stimulées lors d'une infection, une banque de peptides synthétiques couvrant le protéome de souches PRRSV-1 a été utilisée (Mokhtar et al. 2016 ; Mokhtar et al. 2014). Dix-neuf protéines structurales ou non structurales virales ont été analysées et des épitopes T conservés entre différentes souches PRRSV-1 ont été identifiés (Figure 10) et sont localisés dans les protéines nsp1 β , nsp2, GP5, M, RdRp et nsp5. Dans d'autres études préalables, les protéines GP4, GP5, N, nsp2, nsp5 et M avaient déjà été identifiées comme étant des antigènes T (Nan et al. 2017, revue ; Burgara-Estrella et al. 2013 ; Li and Murtaugh, 2012 ; Díaz et al. 2009 ; Zheng et al. 2007 ; Bastos et al. 2004).

Toutefois, l'analyse des épitopes inducteurs de la réponse lymphocytaire T de porcs infectés avec différents PRRSV-1 de sous type 1 et 3 montre que cette réponse est sécrétrice d'IFN γ majoritairement dirigée contre nsp5 (Mokhtar et al. 2016). Nsp5 stimule les cellules CD8^{pos} dont la majorité est polyfonctionnelle, co-sécrétant TNF α et mobilisant la dégranulation cytotoxique (CD107a). Les antigènes T conservés entre souches pourraient être utilisés pour développer des vaccins efficaces contre des souches émergentes. De plus, l'interaction entre les récepteurs T et les peptides présentés par les CMH class I et II tolère une certaine variabilité de séquence dans les peptides, étant donné la « promiscuité » de liaison des récepteurs T.

PRRSV Strain	Geno-type	GenBank Acc. No.	NSP1 β ₁₄₉₋₁₆₃ DQFFFGATHVLTNSP	NSP1 β ₃₄₉₋₃₆₃ DDDVTPGFVRLTSLR	RdRp ₁₄₂₋₁₅₆ HGAGNMGVDGSIWDF	RdRp ₂₆₂₋₂₇₆ YSVMEYLDSRPDTPF	GP5 ₆₁₋₇₅ FDWAVETFVLYPVAT	M ₁₃₋₂₇ AAQKLVLAFSITYTP	M ₁₆₁₋₁₇₃ RAVKRGVVNLVKY
Olot-91	1	X92942
Lelystad	1	AY588319G.....
H2	1	AY035938G.....
		JN862511G.....
		KJ769653G.....
		KJ769654G.....
KJ769655G.....	
Porcilis	1	KF991509	N.....G.....F.....
Cresa3266	1	JF276434I.....G.....
195-05	1	KJ769656	N.N.....L.....	.G.....
		JN862404L.....	.G.....
		KJ769657L.....	.G.....
		KJ769658L.....	.G.....
KJ769659L.....	.G.....	
Cresa3249	1	JF276433NS.....V.....P.....	.Y.....
Cresa3267	1	JF276435N.....P.....
Cresa3256	1	JF276432V.....P.....A.....A.....C.....
Cresa3262	1	JF276431	E.....I.....H.....V.....	.V.....
Cresa2982	1	JF276430	E.....I.....R.....
07V063	1	GU737264	E.....A.....V.....P.....	.Y.....R.....
Lena	1.3	JF802085	.K.....	N.....V.....L.....S.....F.....V.....V.....
SU1-Bel	1.3	KJ769660	.K.....	S.....V.....I.....T.....L.....	.G.V.....S.....F.....V.....IL.....
		KJ769661
		KJ769662
		KJ769663
KJ769664	
VR2332	2	EF536003	.K.....L.....	AGEPSYS..ED.LRI..	..P..T.I..TL...	A..LD.....C.KS..IF..L..	.P..VL.....	K...Q.....

Figure 10 - Comparaison des séquences en acides aminés des régions antigéniques des lymphocytes T identifiées entre différentes souches PRRSV-1 et la souche VR2332, prototype des PRRSV-2

L'analyse révèle que la partie 149-163 aa de nsp1 β et M comporte des peptides antigéniques hautement conservés entre les souches PRRSV-1; seulement deux ou trois aa de substitutions sont observés dans les séquences de la souche "prototype" PRRSV-2. La partie 349-363 aa de nsp1 β , RdRp et la partie 61-75 aa de GP5 sont uniquement conservées entre les souches PRRSV-1. Extrait de (Mokhtar et al. 2014).

iii. Les réponses T régulatrices

Les lymphocytes T régulatrices (regulatory T cells – Treg en anglais) Foxp3^{POS} CD4^{POS} CD25^{POS} sont responsables du maintien de la tolérance et de l'homéostasie (Cecere et al. 2012, revue). L'induction des Treg et des cellules productrices d'IL-10 par les PRRSV est controversée et elle n'est pas toujours retrouvée dans la littérature (Rahe and Murtaugh, 2017a). Il semble que les PRRSV-2 soient capables d'induire des Treg (Silva-Campa et al. 2010 ; Wongyanin et al. 2010), mais pas les souches PRRSV-1 (Silva-Campa et al. 2010). Par ailleurs, la transfection des MoDC et des PAMs avec un plasmide codant la nucléoprotéine N a montré une forte induction des cellules produisant de l'IL-10 et des Treg, que la N soit issue d'un virus de génotype 1 ou 2 (Wongyanin et al. 2012).

La réponse Th17 est couramment identifiée chez l'homme et la souris comme réponse principale dans l'immunité extracellulaire contre les bactéries avec la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22 (Rahe and Murtaugh, 2017a). La réponse Th17 est fortement réduite chez des porcs infectés expérimentalement avec une

souche hautement pathogène PRRSV-2 par rapport à celle induite par une souche faiblement pathogène, et cette réduction est associée à une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire, suggérant un rôle de cette réponse dans le contrôle des infections bactériennes secondaires (**Zhang et al. 2016**).

C. La vaccination contre les PRRSV

1. Les vaccins contre les PRRSV

Contrôler les épidémies de PRRSV comprend au moins quatre actions différentes : le diagnostic, le suivi de l'élevage, la biosécurité et la vaccination. La vaccination contre les PRRSV a plusieurs objectifs : essayer de maîtriser un épisode infectieux, vacciner un cheptel de renouvellement, rappel pour les truies gestantes déjà immunisées et protéger les porcelets, notamment à l'engraissement. De manière générale, la vaccination des cochettes et des truies est destinée à prévenir les troubles de la reproduction tandis que la vaccination des porcelets charcutiers à prévenir les troubles respiratoires.

a. Les vaccins atténués

Depuis la découverte des PRRSV, différents vaccins atténués (Modified-live Vaccines – MLV en anglais) ont été développés contre les souches PRRSV-1 et PRRSV-2 principalement distribués en Europe et aux États-Unis respectivement (**Nan et al. 2017, revue**). Les MLV sont recommandés pour la primovaccination des porcelets et des cochettes ainsi que la revaccination des truies. Il est recommandé de vacciner les truies tous les trois à quatre mois, les porcelets en fin de sevrage et les cochettes de renouvellement pour une acclimatation puis quatre semaines plus tard (**prrs.com, site**). L'efficacité des MLV pour les souches américaines ou européennes a été évaluée et les résultats démontrent une faible induction des réponses humorales et lymphocytaires (**Jeong et al. 2016 ; Zuckermann et al. 2007 ; Díaz et al. 2006**). Les MLV induisent une protection contre les souches homologues et une protection partielle contre les souches hétérologues (**Roca et al. 2012**). Bien qu'efficace, l'utilisation des MLV est controversée. En effet, la principale inquiétude est le risque de réversion de la souche atténuée à une virulence (**Charerntanakul, 2012**). D'autres instabilités de la souche atténuée ont été démontrées telles que la recombinaison avec des souches sauvages (**Wenhui et al. 2012**), une excrétion du virus atténué par les porcs vaccinés aux porcs non

vaccinés ou bien encore la persistance de l'infection. Des travaux indiquent que certains MLV pourraient avoir un effet négatif sur le système immunitaire (**LeRoith et al. 2011**).

b. Les vaccins inactivés

À la différence des MLV, les vaccins inactivés ont été développés à travers le monde pour leur sureté (**Nan et al. 2017, revue**). Ils sont exclusivement destinés à la vaccination des truies immunisées. Depuis 2005, les vaccins inactivés ne sont plus commercialisés aux États-Unis dû à une efficacité trop faible (**Nan et al. 2017, revue**). Ils n'induisent pas de NAbs et de manière générale, des réponses humorales et lymphocytaires très faibles. Contrairement aux MLV, les vaccins inactivés protègent partiellement les porcs contre des souches homologues avec une réduction de la phase virémique et ils ne protègent pas les porcs contre un challenge hétérologue (**Geldhof et al. 2012**)

c. La génétique inverse

Les mutations et les recombinaisons des PRRSV font que les vaccins commercialisés sont faiblement efficaces contre les nouvelles souches émergentes et/ou les souches hétérologues (**Renukaradhya et al. 2015, revue**). Il y a donc une nécessité de développer une nouvelle stratégie vaccinale contre les PRRSV pour induire une cross-protection permettant de contrôler et de prévenir les infections par les PRRSV. Des virus chimériques ont été produits en combinant les séquences de gènes codant une protéine structurale issues de plusieurs souches (**Ni et al. 2013; Zhou et al. 2013; Zhou et al. 2012**) ou bien en construisant un génome synthétique à partir d'une séquence consensus dérivée de l'alignement de 59 souches de PRRSV-2 (**Tian et al. 2015; Vu et al. 2015**). Ces stratégies vaccinales ont induit des protections contre des souches homologues (**Ni et al. 2013**) et des protections encore partielles contre des souches hétérologues (**Tian et al. 2015; Vu et al. 2015; Zhou et al. 2013; Zhou et al. 2012**) avec une induction de NAbs cross-neutralisants (**Tian et al. 2015; Zhou et al. 2013; Zhou et al. 2012**). Le niveau de protection contre un challenge hétérologue était supérieur à celui d'une souche de référence, indiquant que cette stratégie est prometteuse.

d. Les vaccins avec protéines recombinantes et vaccins vectorisés

Pour induire une réponse efficace contre les PRRSV, il est important d'exposer les protéines virales sous forme de complexes hétérodimères (M/GP5) ou hétérotétramères (GP2/GP3/GP4/E) pour induire des NAbs contre les protéines dans leur conformation la plus naturelle possible (**Renukaradhya et al. 2015, revue**). Dans le passé, différents systèmes d'expression de protéines recombinantes ont été utilisés. Les systèmes d'expression par baculovirus de GP3 et 5 ont induit une protection partielle contre les souches homologues in vivo chez la truie gravide (**Duran et al. 1997**). L'utilisation de plantes transgéniques pour l'expression des protéines virales telles que le tabac (**Chia et al. 2010**), la banane (**Chan et al. 2013**), le maïs (**Hu et al. 2012**), la pomme de terre (**Chen et al. 2011**) ou encore les pois cassés (**Vimolmangkang et al. 2012**) ont induit in vivo une réduction de la virémie, une faible production d'anticorps et une protection partielle contre des souches homologues. Ces stratégies se révèlent donc insatisfaisantes, peut-être aussi en raison du manque de connaissance sur les structures antigéniques exposées et protectrices.

Des poxvirus (**Zheng et al. 2007**), des adénovirus (**Jiang et al. 2008 ; Gagnon et al. 2003**) ou encore des fowlpoxvirus (**Shen et al. 2007**) en tant que vecteurs viraux codant GP5 seule (**Gagnon et al. 2003**) ou GP5 en association avec d'autres protéines virales comme GP3 (**Jiang et al. 2008 ; Shen et al. 2007**), GP4 (**Jiang et al. 2008**) ou bien M (**Zheng et al. 2007**) ont montré de fortes inductions de réponses humorales et lymphocytaires lors de combinaison de ces protéines virales, avec une production de NAbs (**Jiang et al. 2008**). Néanmoins, la protection hétérologue reste un obstacle.

e. Les vaccins à ADN

Les maladies infectieuses représentent une menace continue pour les animaux de compagnie, rente et sauvages. Il est généralement observé que la vaccination à ADN est moins efficace chez les grands animaux que chez la souris. Toutefois, quatre licences de vaccins à ADN existent en santé vétérinaire : Salmon Pancreas Disease chez les saumons depuis 2017, le mélanome canin depuis 2010, West Nile Virus chez le cheval depuis 2009 et Nécrose Hématopoiétique Infectieuse chez les saumons depuis 2005 (**Tregoning and Kinnear, 2014**).

La vaccination à ADN consiste à transfecter un plasmide codant un ou des gènes d'intérêts dans les cellules de l'hôte in vivo. Cette stratégie vaccinale induit de bonnes

réponses humorales et cytotoxiques (**Hasson et al. 2015**). Les plasmides vaccinaux sont décrits comme thermostables en comparaison aux autres approches vaccinales, plus sûrs que les MLV, ne présentant pas de risques de réversion à une virulence (**Tregoning and Kinnear, 2014**). La production à grande échelle est sûre et maîtrisée, avec un coût abordable et les plasmides sont adaptables aux souches circulantes (**Prather et al. 2003, revue**). Cette adaptabilité aux différents pathogènes et différents gènes peuvent être combinés simultanément, ce qui permet de mettre au point des vaccins contre plusieurs souches d'un pathogène et d'approches de combinaison contre plusieurs pathogènes (**Redding and Werner, 2015**).

L'expression du plasmide vaccinal se fait dans les cellules présentes au site d'injection de l'hôte telles que les cellules dendritiques ou les myocytes lors d'une injection intramusculaire (**Tregoning and Kinnear, 2014**) ou bien les kératinocytes lors d'une injection intradermique (**Martinon et al. 2009**). Le mécanisme d'entrée du plasmide dans les cellules locales n'est pas clairement défini et dépend du type cellulaire mais aussi de la méthode d'injection. Le cheminement du plasmide jusqu'au noyau cellulaire rencontre plusieurs obstacles tels que la fragmentation par les nucléases cytosoliques et le franchissement des membranes cellulaires et nucléaires (**Tregoning and Kinnear, 2014**). Une étude antérieure a estimé que moins de 0,1 % du plasmide vaccinal qui entre dans le cytosol arrivera jusqu'au noyau où il sera transcrit (**Capecchi, 1980**). Ce transit dans la cellule peut avoir un effet sur l'activation de la réponse innée et par conséquent sur l'immunogénicité du vaccin (**Suschak et al. 2016**).

Des vaccins à ADN expérimentaux ont été testés contre des maladies infectieuses des animaux de compagnie comme la péritonite infectieuse féline chez le chat (**Glansbeek et al. 2002**) ou la rage chez le chien (**Tesoro Cruz et al. 2006**), ou des animaux de rente comme la pseudotuberculose chez le mouton (**Chaplin et al. 1999**), l'herpèsvirus bovin chez le veau (**Quattrocchi et al. 2017**). Ces vaccins expérimentaux ont induit des réponses lymphocytaires et des réponses humorales variables. Des cas d'inflammations après la vaccination à ADN ont été reportés, principalement liés au mode d'administration, mais elles sont en général bien tolérées (**Ahlén et al. 2007**).

Plus particulièrement chez le porc, plus de 1000 publications ont testé l'efficacité de la vaccination à ADN contre différentes maladies comme la maladie d'Aujeszky (**Dory et al. 2005**), la grippe (**Karlsson et al. 2018**) ou bien la peste porcine africaine (**Pérez-Núñez et al. 2019**). Il a été démontré chez différents modèles (dont le porc) que le mode d'administration impactent sur l'immunogénicité des vaccins à ADN. L'électroporation (cf. partie. III.C.2.b.ii.)

a été démontrée comme particulièrement efficace pour augmenter l'efficacité des vaccins à ADN (**Le Moigne et al. 2012 ; Babiuk et al. 2002**). Il a aussi été montré que l'injection de plasmide par la voie intradermique induirait de meilleures réponses humorales avec l'induction de NAbs par rapport à la voie intramusculaire (**Dory et al. 2009**). Un des inconvénients potentiels des vaccins à ADN est qu'il existe une possibilité théorique que le plasmide vaccinal puisse s'intégrer dans le génome de l'hôte. Des tests chez la souris et chez le porc ont montré le niveau d'expression des plasmides étaient inférieurs à la limite recommandée par la FDA (Food and Drug Administration) pour rechercher des événements d'intégration des plasmides dans le génome de l'hôte (**Dory et al. 2015**). De plus, il a été mis en évidence qu'une injection unique de plasmide à faible quantité (< 15 µg) était efficace pour induire une protection des porcs contre la maladie d'Aujeszky (**Dory et al. 2005**).

La vaccination à ADN est une alternative vaccinale prometteuse contre les infections par les PRRSV. Comme pour les vaccins vectorisés, des études de vaccination à ADN contre les PRRSV ont immunisé des souris ou des porcs soit avec une protéine structurale, le plus souvent avec GP5 (**Tang et al. 2014 ; Wang et al. 2013 ; Du et al. 2012 ; Li et al. 2009 ; Jiang et al. 2006 ; Fang et al. 2006**) soit en combinant GP5 avec d'autres protéines telles que GP3 (**Du et al. 2012**) ou M (**Jiang et al. 2009**). Chez la souris, il y a induction de réponses humorales et lymphocytaires (**Wang et al. 2013 ; Li et al. 2009 ; Fang et al. 2006 ; Jiang et al. 2006**) confirmées chez le porc (**Tang et al. 2014 ; Du et al. 2012 ; Jiang et al. 2009**), avec une protection homologue et une production de NAbs (**Tang et al. 2014 ; Du et al. 2012**). Toutefois, une étude a montré une exacerbation chez des porcs immunisés avec un plasmide codant GP5 et M (**Diaz et al. 2013**). Enfin, des vaccins à ADN visant l'induction de réponses lymphocytaires T ont été produits à partir des séquences communes entre 748 GP5 d'isolats différents (GP5 mosaïques) (**Cui et al. 2016**). Là encore une protection partielle a été obtenue.

Pour améliorer la vaccination à ADN, deux études ont proposé d'immuniser des porcs en combinant des vaccins à ADN et des MLV: des porcs immunisés avec un plasmide codant une N tronquée ou N complète puis "boostés" avec un MLV hétérologue ont induit des réponses humorales et lymphocytaires, avec une augmentation de la production de NAbs, et une réduction de la réponse lymphocytaire T régulatrice, qui est proposée comme associée aux effets immunomodulateurs négatifs de certains MLV (**Sirisereewan et al. 2017 ; Suradhat et al. 2015**). Toutefois cette stratégie utilisant N seule n'a pas conduit à la moindre réduction de charge virale.

Ainsi, la vaccination avec un plasmide codant pour un seul antigène tel que N ne serait pas suffisante pour induire une protection. Il faudrait donc viser une stratégie vaccinale combinant une sélection d'antigènes d'intérêt tout en évitant une exacerbation.

Résumé des principales caractéristiques des vaccins PRRSV

Type de vaccin	Licence	Avantages	Inconvénients
Atténué	Commercialisé UniStrain Porcilis®PRRS	Abordable Une injection Facile à produire Réponses humorales et lymphocytaires	Réversion virale Recombinaison Excrétion virale Protection hétérologue limitée Non DIVA ¹
Inactivé	Commercialisé Eryseng Progressis	Pas de risque de réversion	Peu efficace Uniquement comme rappel Pas de réponses lymphocytaires Non DIVA ¹
Génétique inverse	Expérimental	Bonne immunogénicité Protection hétérologue améliorée	OGM Réversion virale possible
Vectorisé	Expérimental	Pas de risque de réversion DIVA ¹	OGM Faible réponse humorale Protection partielle homologue
ADN	Expérimental	Sûr Abordable Thermostable Pas de risque de réversion Adaptable aux souches émergentes DIVA ¹	Exacerbation reportée avec GP5 Nécessite optimisation chez le porc

¹: permet de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

2. Les modes d'administration non muqueuse des vaccins et cas particulier de la vaccination à ADN

a. Les voies d'injection des vaccins

i. La voie intramusculaire (IM)

La quasi-totalité des vaccins sont administrés par voie intramusculaire (IM) (Combadiere and Liard, 2011, revue). L'IM consiste à introduire une aiguille à 90°C (diamètre entre 0,60 mm et 0,90 mm) jusqu'au tissu musculaire sous la couche adipeuse (Figure 11A). Le volume injecté peut être important (de 0,1 mL à 5 mL en une seule fois). Les sites d'injection sont le plus souvent dans l'épaule. Les effets indésirables après injection sont assez nombreux allant de l'hématome local jusqu'à la nécrose des tissus cutanés et sous-cutanés. Le muscle comprend très peu d'APC résidentes. La vascularisation du muscle est plus dense que celle du tissu sous-cutané. L'administration est facile et le vaccin se diffuse

rapidement par voie lymphatique et potentiellement sanguine dans l'organisme. Après une injection, des leucocytes et des APC sont recrutée sur le site d'injection par attraction via l'expression de molécules inflammatoires (Combadiere and Liard, 2011, revue).

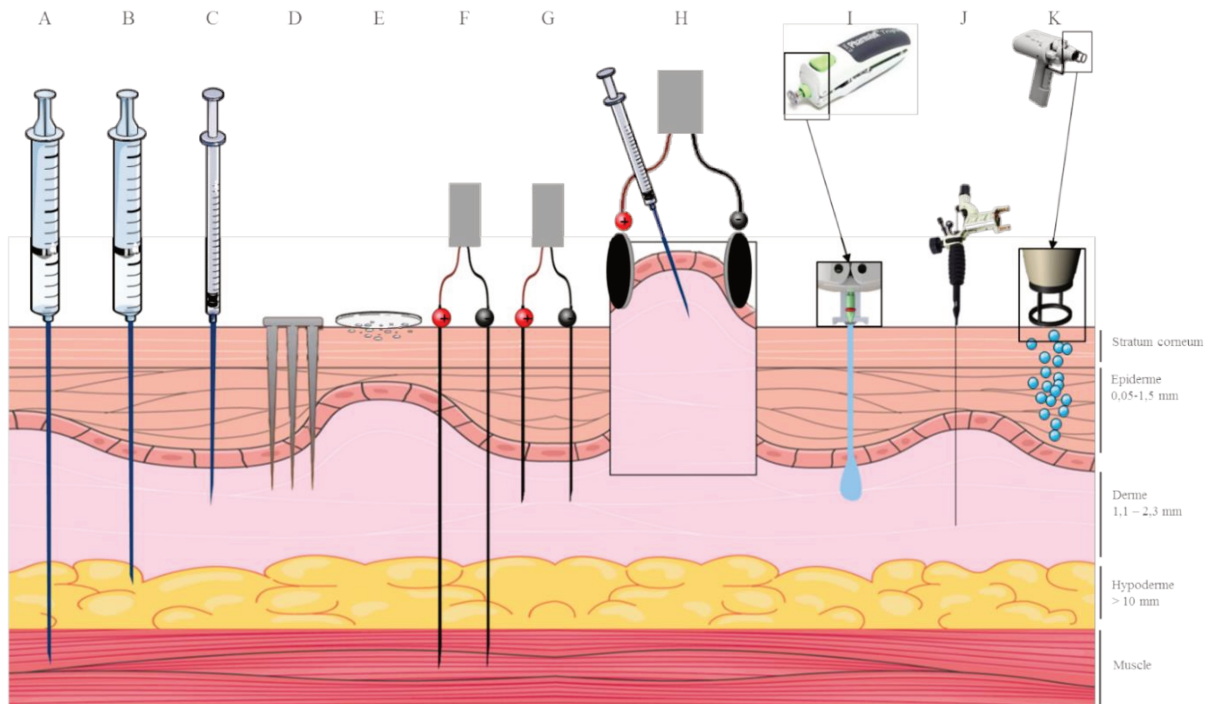


Figure 11 - Schéma des différentes méthodes d'immunisation et leur zone de diffusion

- A. Intramusculaire
 - B. Sous-cutanée
 - C. Intradermique
 - D. Transcutanée micro-aiguilles solides
(extrait de **Kim et al. 2012**)
 - E. Épicutanée
 - F. Électroporation intramusculaire
(aiguilles électrodes – extrait de **Grunwald and Ulbert, 2015**)
 - G. Électroporation intradermique
(aiguilles électrodes - extrait de **Grunwald and Ulbert, 2015**)
 - H. Intradermique suivie d'électroporation à la surface de la peau
 - I. Jet sous pression sans aiguille (Pharmajet's Tropis ®)
(extrait de **pharmajet.com/tropis-id, site**)
 - J. Tattoo
 - K. Gene-gun (Helios ® Gene-gun system)
(extrait de **bio-rad.com, site**)
- L'échelle entre les matériels utilisés n'est pas respectée

ii. La voie sous-cutanée

La vaccination par voie sous-cutanée est la principale méthode d'administration avec l'IM (**Combadiere and Liard, 2011, revue**). La SC consiste à introduire une aiguille à 45°C (diamètre entre 0,50 mm et 0,7 mm < IM) jusqu'à l'hypoderme, préférentiellement au niveau de bras ou de la cuisse (**Figure 11B**). L'abondance des APC résidentes est faible, la vascularisation de l'hypoderme est assez riche et les volumes à injecter sont identiques à l'IM. La diffusion du vaccin est plus lente par rapport à l'IM.

Les voies cutanées telles que les voies intradermiques (ID), transcutanées et épidermiques sont des alternatives d'immunisation (**Nicolas and Guy, 2008, revue**). Ces stratégies d'immunisation visent à optimiser la réponse vaccinale, notamment en impliquant les cellules immunes de la peau, telles que les APC et plus particulièrement les DC dermiques, les cellules de Langerhans (Langerhans Cells – LC en anglais) et les macrophages, selon la profondeur de l'injection.

iii. La voie intradermique (ID)

L'ID est la troisième principale technique d'administration des vaccins. De manière générale, l'ID consiste à introduire une aiguille biseau vers le haut (diamètre à 0,45 mm < sous-cutanée) tangentiellement à la peau et elle doit rester superficielle, préférentiellement à la face antérieure de l'avant-bras. Le volume des ID est entre 100 µL et 200 µL soit 5 - 50 fois moins que par les voies IM ou sous-cutanée (**Combadiere and Liard, 2011, revue**). Cette technique est difficile à réaliser et nécessite une certaine pratique car la profondeur de l'aiguille est primordiale. Cette technique peut provoquer des réactions inflammatoires locales telles que des œdèmes ou des érythèmes (**Combadiere and Liard, 2011, revue**).

Différentes techniques peuvent être utilisées pour réaliser une ID dont la technique de Mantoux (**Mantoux, 1908, comptes rendus**), qui consiste à étendre la surface de la peau et à insérer une aiguille presque parallèlement à la surface de la peau. Une papule blanche apparaît au moment de l'injection pouvant causer des douleurs pendant l'injection (**Figure 11C**). Cette technique a couramment été utilisée pour administrer le vaccin du bacille de Calmette et Guérin (BCG) (**Lambert and Laurent, 2008, revue**). Plus tard, des systèmes d'injection intradermiques sans aiguilles ont été testés, que je développerai dans une autre partie (cf. partie III.C.2.b.iii.).

iv. La voie transcutanée avec des micro-aiguilles

Les micro-aiguilles sont une alternative aux aiguilles classiques et améliorent la sécurité, l'acceptabilité, réduisent la douleur et induisent une efficacité au moins semblable à celle des méthodes de vaccinations à aiguilles classiques. L'administration transcutanée consiste à introduire des micro-aiguilles (diamètre inférieur à 0,45 mm < ID) qui délivrent le vaccin dans l'épiderme et/ou le derme (**Figure 11D**) (**Combadiere and Liard, 2011, revue**). Cette méthode d'injection est facile à réaliser et elle ne nécessite pas d'être faite par un professionnel (**Suh et al. 2014**).

Différents types de micro-aiguilles existent et leur assemblage se présente sous forme de patches (**Kim et al. 2012**):

- des patches à micro-aiguilles solides (en silicone, en métal ou encore en céramique) peuvent être utilisés comme prétraitement avant de déposer la préparation vaccinale (**Figure 11**), sous forme de crème, de gel ou de lotion qui diffusera à travers les pores formés par les micro-aiguilles (**Dean et al. 2005**) ;

- des patches à microaiguilles solides recouvertes de vaccin ou creuses ont été développés pour permettre une diffusion du vaccin dans derme et/ou épiderme (**Hiraishi et al. 2011 ; Kim et al. 2010 ; Koutsonanos et al. 2009**) (**Beran et al. 2009**) ;

- des patches à microaiguilles en polymères dégradables qui encapsulent le vaccin (**Figure 11**) ont été développés. Ces patches sont thermostables et faciles d'emploi (**Vrdoljak et al. 2016**). Les micro-aiguilles sont totalement dissoutes dans la peau et diffusent le vaccin (**Vrdoljak et al. 2012; Hoang et al. 2015 ; Sullivan et al. 2010**).

Plus de 350 publications montrent l'efficacité des micro-aiguilles pour administrer une large gamme de médicaments et de vaccins aussi bien inactivés que les MLV ou encore les vaccins à ADN dans différents modèles tels que la souris, le porc ou encore l'homme. Les réponses lymphocytaires et humorales spécifiques des virus étudiés étaient généralement plus élevées que celles obtenues par voie IM. Les études ont principalement comparé dans les deux voies des vaccins influenza (**Vrdoljak et al. 2016 ; Koutsonanos et al. 2009 ; Kim et al. 2010 ; Song et al. 2010 ; Sullivan et al. 2010**), des vaccins BCG (**Hiraishi et al. 2011**), des vaccins hépatite B (**Hirschberg et al. 2010 ; Hoang et al. 2015 ; Andrianov et al. 2009**) ou encore des vaccins Human Papillomavirus (**Corbett et al. 2010**).

v. La voie transcutanée sans microaiguille ou épicutanée

Contrairement aux techniques précédentes, la voie épicutanée consiste à délivrer les vaccins sur la peau sans micro-aiguilles. Plusieurs approches ont été suivies:

- enlever les poils du follicule par friction, avec un scotch ou par CSSS (Cyanoacrylate Skin Surface Stripping) chez la souris et l'homme. L'emplacement vide du follicule est utilisé pour la pénétration de vaccins protéiques (**Vogt et al. 2008**), adsorbés sur des nanoparticules chez l'homme (**Baroli et al. 2007 ; Vogt et al. 2006**) et la souris (**Mahe et al. 2009**), ou encore des vaccins à ADN enveloppés dans un liposome chez le hamster (**Lieb et al. 1992**).
- apposer un patch induisant l'hydratation de la couche cornée, pour permettre le passage des composants vaccinaux. Ceci peut être obtenu par un patch occlusif induisant la perspiration chez la souris, le porc et l'homme (**Figure 11E**). Classiquement utilisée dans le diagnostic d'allergie (**Katz and Goldberg, 2017 ; Jones et al. 2017**), cette méthode a été évaluée avec succès pour administrer un vaccin nanoparticulaire contre le RSV (Respiratory Syncytial Virus) (**Hervé et al. 2016**). Des réponses humorales, Th1, Th17 et Treg ont été induites, avec protection contre l'infection RSV chez la souris.

Des patches contenant de l'hydrogel ont aussi été tests avec succès. L'hydrogel permet le passage de vaccins protéiques (150 kDa) au travers de l'épiderme par hydratation de la couche cornée. Des réponses Th2 contre les toxines tétaniques et diphtériques ont été obtenues (**Matsuo et al. 2013, revue**).

b. Les méthodes de vaccination à ADN et les sites d'injection

Les vaccins à ADN ont de nombreux avantages cités précédemment (cf. partie III.C.1.e.). Toutefois, l'efficacité de transfection et d'expression *in vivo* des vaccins à ADN, ainsi que l'immunogénicité induite, dépendent de la quantité d'ADN, du volume d'injection, de sa formulation, et de la méthode d'administration utilisées (**Tregoning and Kinnear, 2014, revue**). Le vaccin à ADN subit des dégradations rapides dans le milieu extracellulaire suite à son administration. Il doit franchir la membrane plasmique, selon des mécanismes qui dépendent de la méthode de transfection d'ADN utilisée. Une fois dans le milieu intracellulaire, le plasmide subit une fragmentation par les nucléases présentes dans le cytosol et puis il traverse la membrane du noyau cellulaire, ce qui concerne moins de 0,1% de la quantité initiale du plasmide (**Tregoning and Kinnear 2014, revue**). L'acheminement du

plasmide vers le noyau cellulaire conduit à l'activation du complexe pro-inflammatoire Aim2-inflammasome, et des voies de signalisations STING-TBK1-IRF3, impliquées dans l'immunogénicité des vaccins à ADN (**Suschak et al. 2015**). Le plasmide se maintient dans le noyau sous la forme d'un épisode, est transcrit en ARNm puis traduit dans le cytosol.

i. Les voies intramusculaire et intradermique

L'IM et l>ID sont les voies les plus communes pour administrer des vaccins à ADN (**Davis, 2000**). En général l'IM « simple » (par aiguille classique) présente une certaine efficacité chez la souris, mais beaucoup moins chez les espèces vétérinaires et chez l'homme (**Dupuis et al. 2000**). L'internalisation et l'expression des plasmides sont obtenues dans les cellules musculaires et les monocytes, et quelques APC (**Saade and Petrovsky, 2012, revue**). L>ID « simple » nécessite moins de quantité d'ADN que l'IM (**Elnekave et al. 2011, revue**). Toutefois l'injection simple d'ADN est généralement faiblement immunogène et il est nécessaire d'employer des techniques augmentant la transfection *in vivo*, la protection de l'ADN, et l'effet adjuvant.

ii. L'électroporation

L'électroporation (EP), devenue la méthode de référence, est utilisée depuis plus de 25 ans (**Bodles-Brakhop et al. 2009**). Cette méthode consiste à délivrer après une IM ou une ID, un champ électrique entraînant une instabilité des membranes cellulaires conduisant à la formation de pores, permettant l'entrée des plasmides dans les cellules. En plus, l'EP induit la libération d'ATP (**Calvet et al. 2014**), l'expression de calreticuline à la surface cellulaire (**Schultheis et al. 2018**), et de cytokines inflammatoires (**Todorova et al. 2017**), le tout agissant comme effet adjuvant. L'efficacité de l'EP peut être optimisée à différents niveaux : combinaison de voies d'injection, nombre de répétitions, durée de l'impulsion électrique, intervalle de temps entre chaque impulsion ou encore le champ appliqué. Les administrations IM+EP (**Figure 11F**) ou ID+EP (**Figure 11G-H ; Figure 12E-D**) augmentent significativement les réponses humorales spécifiques et lymphocytaires cytotoxiques chez différents modèles animaux par rapport aux injections simples (**Todorova et al. 2017 ; Roos et al. 2009**). Dans l'ensemble, les deux voies d'injection (IM ou ID) induisent des niveaux comparables d'immunité, mais la voie ID est plus accessible, elle est plus riche en APC, elle est moins invasive et des dispositifs ont été mis en place pour qu'elle soit peu douloureuse

(Roos et al. 2009). Toutefois, ces deux voies peuvent induire des orientations immunitaires différentes, et le site même d'injection (oreille ou abdomen) influence également les réponses (Vandermeulen et al. 2015). Enfin un vaccin à ADN contre le VIH combinant ID+EP et IM+EP concomitantes ont induit des réponses humorales de plus haute affinités et des réponses lymphocytaires plus élevées et persistantes que les voies séparées chez la souris (Mann et al. 2014).

iii. Les jets sous pression sans aiguilles intramusculaires ou intradermaux

Le développement de techniques sans aiguilles diminue l'appréhension des personnes face à la vaccination et augmentent la sécurité (Raviprakash and Porter, DNA vaccines, 2006, livre). La méthode sans aiguille consiste à pulvériser les plasmides permettant aux plasmides d'être délivrés dans le cytoplasme cellulaire, soit dans le muscle, soit dans le derme (Saade and Petrovsky, 2012, revue). Simple à utiliser, la douleur ressentie lors de l'injection est modérée (Arapostathi et al. 2010) et la dose injectée est réduite. Il existe différents systèmes d'injection sans aiguilles (Ravi et al. 2015) :

- injection sous pression au CO₂ comprimé (exemple Biojector®) qui induit des réponses humorales et lymphocytaires CD8^{pos} sécrétrices d'IFN γ supérieures à l'IM ou l>ID (Graham et al. 2013 ; Aguiar et al. 2001) aussi bien chez les lapins (Aguiar et al. 2001) que chez l'homme (Graham et al. 2013) ;
- injection par ressort (exemple PharmaJet Tropis®) (Figure 12G-H) qui induit des réponses humorales robustes avec une production d'anticorps neutralisants (Kwilas et al. 2014) et lymphocytaires aussi efficaces qu'avec une aiguille (MacAllister et al. 2014) chez le porc contre le virus influenza (Grodeland et al. 2016), le mélanome canin (Zuleger et al. 2017) ou encore est en essais cliniques chez l'homme contre un Hantavirus (Andes Virus, NCT03682107), et le virus Zika (NCT02840487).

iv. Les micro-aiguilles

Les différents types de micro-aiguilles présentées précédemment (Figure 11D ; Figure 12I-J) (cf. partie III.C.2.a.iv.) ont été utilisées pour le développement de vaccins à ADN, et ont montré leur capacité à favoriser la transfection in vivo et l'immunogénicité (Mikszta et al. 2002). Un vaccin à ADN codant l'hémagglutinine du virus influenza a été co-administré avec

un vaccin inactivé par des patches à micro-aiguilles en métal et a induit des réponses hétérologues humorales protectrices robustes, supérieures à celles induites avec un ADN contrôle, chez la souris (**Kim et al. 2013**). Un vaccin à ADN contre l'hépatite B adsorbé à des nanocomplexes a induit des réponses humorales et lymphocytaires supérieures qu'en IM chez la souris (**Yin et al. 2013**).

v. La vaccination par tatouage

La vaccination à ADN par tatouage est une méthode intradermique invasive qui consiste à appliquer des vibrations répétées avec de multiples micro-aiguilles (**Figure 11J**) (**Pokorna et al. 2008**). Le volume injecté est cinq fois plus petit qu'en IM mais, il nécessite de traiter de grandes surfaces cutanées et de façon répétées (**Quaak et al. 2009 ; Pokorna et al. 2008**). Le tatouage cause des réactions inflammatoires locales qui agissent comme un adjuvant naturel (**Chiu et al. 2012**). La vaccination à ADN par tatouage induit des réponses humorales spécifiques et lymphocytaires élevées chez la souris et le macaque (**Oosterhuis et al. 2012 ; Corder et al. 1996**).

vi. Le gene-gun

La technique du gene-gun consiste à bombarder des particules d'or auxquelles sont adsorbés les plasmides jusqu'au derme sans aiguilles (**Figure 11K**) (**Saade and Petrovsky, 2012, revue ; Fuller et al. 2006, revue**). La dose à injecter est faible (1 – 10 µg). C'est une technique peu douloureuse mais coûteuse dont le matériel nécessite un entretien particulier. Après injection, des réactions locales sont possibles telles que des rougeurs, des décolorations, des œdèmes ou encore des démangeaisons. Les plasmides sont ainsi injectés directement dans le cytoplasme cellulaire des APC et des kératinocytes. Le gene-gun induit des réponses humorales et lymphocytaires chez la souris, le porc, le primate non humain ou encore chez l'homme, contre les virus de l'hépatite B, le VIH, Ébola, ou encore le virus influenza (**Fuller et al. 2006, revue**).

vii. Les formulations

Plusieurs types de nanoparticules biodégradables de poly(lactide-co-glycolide) (PLGA NP), des particules de chitosan (**Zhao et al. 2014**), ainsi que des liposomes cationiques

(Niborski, 2006) ont été utilisés avec succès pour induire des réponses immunes chez différentes espèces. Ces nanoparticules ont pour objectif de favoriser la protection de l'ADN dans le milieu extracellulaire, son entrée dans les cellules par fusion ou endocytose, son cheminement intracellulaire vers le noyau. En particulier, les nanoparticules de PLGA NP sont sûres, faciles à produire et elles sont rendues cationiques par traitement chimique de sorte d'adsorber à leur surface les plasmides anioniques (Kumar et al. 2012). Les nanoparticules de PLGA NP couplées à des vaccins à ADN induisent des réponses humorales avec production d'anticorps neutralisants et lymphocytaires robustes supérieures à la forme d'ADN nu chez la souris, le hamster et le singe (Kumar et al. 2012 ; O'Hagan et al. 2001).

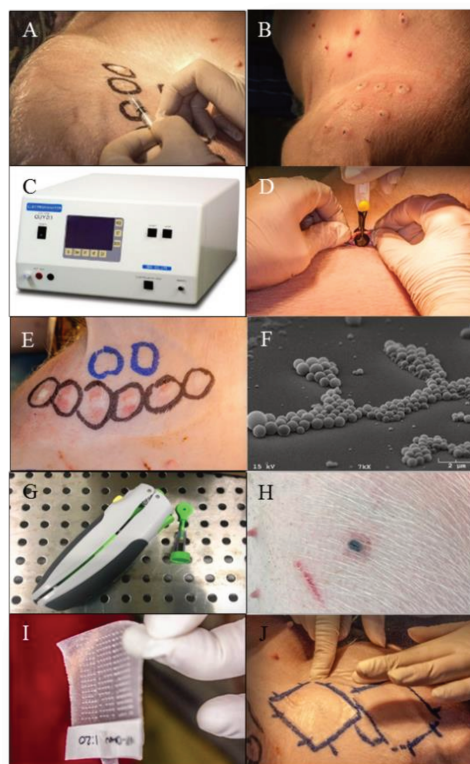


Figure 12 - Planche photographique de quelques techniques utilisées en vaccination à ADN (A, B, D, E, G, H, I, J, photos prises par moi-même dans les expérimentations de ma thèse)

- A. Intradermale (ID) dans l'ischium d'un porc
- B. Papules après ID dans l'ischium d'un porc
- C. Électroporateur CUY21
- D. Électroporation en surface dans l'ischium d'un porc
- E. Inflammation après électroporation
- F. Nanoparticules PLGA NP, <http://coecs.ou.edu/Brian.P.Grady/plga.html>
- G. PharmaJet's Tropis® Needleless injection
- H. Injection sous pression avec le PharmaJet's® Tropis Needleless d'un porc avec une encre de tatouage
- I. Patch micro-aiguilles biodégradables (DMN)
- J. Application des DMN sous-costale

La charge électrique globale des nanoparticules de PLGA NP + ADN a son importance dans la capture par les APC et l'immunogénicité, la charge totale positive étant favorable (**Kumar et al. 2012**). Enfin, la combinaison de l'adsorption sur des nanoparticules de PLGA avec EP par IM a montré un bénéfice sur l'immunogénicité d'un plasmide par rapport à PLGA seul, avec libération d'acide urique et de HMGB (High Mobility Group Box) qui joueraient un rôle d'adjuvant (**Barbon et al. 2010**)

D. Le ciblage des cellules présentatrices d'antigène (APC-targeting) ou ciblage des cellules dendritiques (DC-targeting)

Depuis le début des années 2000, de nombreux travaux, principalement réalisés chez la souris, ont montré qu'il était possible d'augmenter fortement les réponses vaccinales humorales et lymphocytaires, en particulier les réponses T CD8^{pos} et Th1, en adressant les antigènes aux APC, notamment les cDC. Le principe est que l'antigène délivré dans les tissus est dirigé vers une cellule efficace en présentation antigénique, évitant sa dégradation et son élimination. En fonction du récepteur endocytaire choisi, il est possible de conduire l'antigène vers des voies de routage intracellulaire favorable à un type de présentation (CMH class I ou II) et de cibler un type d'APC spécialisée dans la fonction souhaitée (inductrice de réponse lymphocytaire T CD8^{pos} et Th1 dans le cas des cDC1, de réponses Th2 dans le cas des cDC2).

Le ciblage des antigènes aux DC a été utilisé pour améliorer l'efficacité de vaccins protéiques et aussi de vaccins à ADN pour induire de meilleures réponses lymphocytaires, (**Lehmann et al. 2016, revue ; Fossum et al. 2015 ; Alvarez et al. 2013, revue ; Nchinda et al. 2008**). L'amélioration des réponses immunitaires induites par le ciblage des APC ou des DC en vaccination a également été évaluée chez le porc. Il a été démontré qu'adresser GP4 d'un PRRSV-1 à la sialoadhésin CD169, en vaccination protéique augmentait les réponses cellulaires et humorales avec une induction de NAb et un bénéfice mineur sur l'élimination virale par rapport au vaccin protéique non ciblé (**Ooms et al. 2013**). Une équipe de recherche américaine ont évalué le ciblage des DC porcines via les récepteurs DC-SIGN (**Subramaniam et al. 2014**), Langerin (**Subramaniam et al. 2017a**) ou DEC205 (**Subramaniam et al. 2017b**) couplé à une vaccination protéique contre le PRRSV ou le PEDV (Porcine epidemic Diarrhea Virus) (**Subramaniam et al. 2017a**). Ces stratégies ont augmenté les réponses cellulaires CD4^{pos} et CD8^{pos} IFN γ spécifiques des pathogènes, mais

n'ont pas réussi à induire une protection contre une souche hétérologue (**Subramaniam et al. 2017b**). De plus, mon équipe a adressé l'ectodomaine de la protéine M2 (appelée M2e) du virus influenza aux DC via XCR1 en vaccin protéique. Le ciblage des DC a augmenté la réponse humorale par rapport à la forme non ciblée de M2e (**Deloizy et al. 2017**).

Peu d'études ont évalué l'efficacité de combiner la vaccination à ADN avec le ciblage des APC ou des DC chez le porc. L'administration par la méthode du gene-gun d'un vaccin à ADN codant l'ovalbumine fusionnée à CTLA-4, a augmenté les réponses humorales IgG et IgA spécifiques de l'ovalbumine (**Tachedjian et al. 2003**). Un vaccin à ADN codant des épitopes B et T du virus de la fièvre aphteuse fusionnés à un anticorps à fragment à chaîne unique (Single chain Fragment variable – ScFv en anglais) anti-CMH class II a amélioré les réponses lymphocytaires T IFN γ et humorales avec une induction de NAb (**Borrego et al. 2011**). Cette stratégie a induit une protection homologue chez les porcs vaccinés.

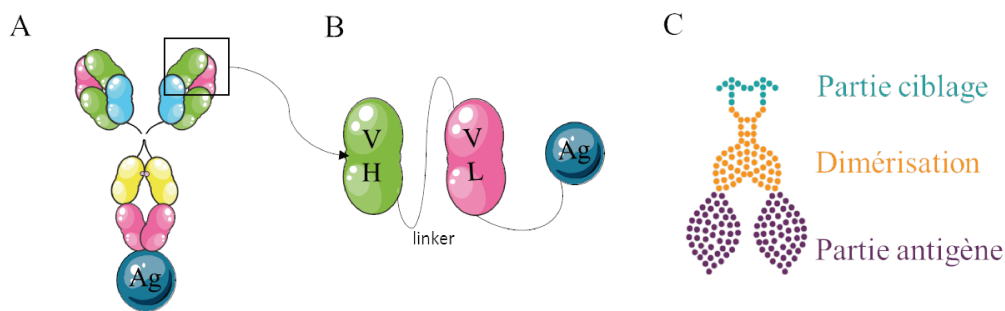


Figure 13 - Représentation de différentes stratégies utilisées pour l'APC-targeting

- L'anticorps dirigé contre les APC est relié à l'antigène par clonage moléculaire, chimique ou liaison non covalente
- Les ScFv sont composées des régions variables légères et lourdes reliées entre-elles par un linker, démunies de leur fragment constant. Les ScFv sont reliés aux antigènes par un linker
- Vaccibodies sont constitués de trois unités : une partie ciblage dirigée contre un récepteur particulier (anticorps ou ScFv ou ligand du récepteur), une partie de dimérisation de la structure (région charnière d'un anticorps couplé à une région CH3 d'un anticorps IgG3 humain), et une partie antigénique

1. Ciblage moléculaire des APC

a. Les anticorps fusionnés aux antigènes

L'anticorps dirigé contre le récepteur d'intérêt à la surface des cellules cibles est directement fusionné à l'antigène candidat (**Figure 13A**) (**Lehmann et al. 2016, revue**), soit par un processus de couplage par liaison chimique ou par un clonage génétique produisant à une protéine de fusion recombinante anticorps-antigène. Le clonage présente des avantages

par rapport aux liaisons chimiques : la connaissance exacte du nombre de molécules couplées, le contrôle de la concentration d'endotoxine et enfin, il permet de modifier génétiquement l'anticorps utilisé (humanisation par exemple).

b. Les anticorps à fragment unique à chaîne unique ou ScFv

Il est possible d'optimiser ces recombinants anticorps-antigène en réduisant leur immunogénicité et leur taille (**Feige and Buchner, 2014, revue**). En retirant le fragment Fc et les parties constantes du fragment Fab, il est possible de relier la partie C-terminale du fragment variable léger à la partie N-terminale du fragment variable lourd par un peptide linker, et de former un anticorps à fragment à chaîne unique (Single chain Fragment variable – ScFv en anglais) (**Figure 13B**). Ce sont des monomères, plus petits que les anticorps parentaux, plus faciles à produire et diminuent le risque d'interférence entre les fragments Fc et les cellules exprimant le récepteur aux Fc. Les antigènes peuvent être reliés aux ScFv via un linker. Nous avons utilisé un ScFv-anti-CD11c porcine dans la stratégie de vaccination contre le PRRSV chez le porc (résultats présentés dans l'**article 3**).

c. Les vaccibodies

L'équipe norvégienne de Bjarne Bogen (Université d'Oslo) et la société Vaccibody qui est partenaire de notre projet européen SAPHIR (**vaccibody.com**) ont développé des structures de ciblage appelées « vaccibodies » (VB). Les VB sont composés de trois unités : une partie APC-targeting (un anticorps ou un ScFv ou un ligand d'un récepteur), une partie de dimérisation (région charnière et CH3 d'une IgG3 humaine) et une partie antigénique (**Figure 13C**). Les vaccins VB sont rapidement et facilement modifiables. Vaccibody a des données issues d'essais précliniques dans une large gamme de modèle animal contre les cancers ou les maladies infectieuses. Des études ont montré que les VB induisent des protections contre le virus influenza, l'herpès virus 2 ou encore la tuberculose, en induisant des anticorps neutralisants et des réponses lymphocytaires T auxiliaires après une seule injection. Dans notre stratégie de vaccination contre le PRRSV, nous avons comparé des VB ciblant deux récepteurs XCR1 et CD11c administrés chez les porcs (résultats présentés dans les **articles 3 et 4**).

d. Les anticorps fusionnés aux antigènes par des liaisons non covalentes

Les complexes anticorps-antigènes peuvent être reliés par des liaisons non covalentes telles que la biotine-streptavidine (**Dong et al. 2013**) ou la dockerin-cohésine (**Flamar et al. 2012**) et leur emploi en DC-targeting augmentent fortement les réponses lymphocytaires T spécifiques CD4^{pos} et CD8^{pos} et humorales. Nous avons vacciné des porcs avec des antigènes du virus influenza ciblés au CD11c en utilisant cette approche et nous avons baptisé ces structures Vaccicomplexes, présentées dans l'**article 1**.

2. Les récepteurs ciblés

Le récepteur ciblé détermine le routage intracellulaire après capture et internalisation de l'antigène et donc sa voie de présentation aux cellules CD4^{pos}, CD8^{pos} ou aux cellules B et il détermine le sous-type de DC ciblé si le récepteur est exprimé sélectivement (**Alvarez et al. 2013, revue**). De nombreux récepteurs ont été évalués avec succès dans le modèle murin, et quelques récepteurs chez de plus grands mammifères. Bien que les différentes sous-populations de DC sont caractérisées chez le mouton, le porc ou encore le singe, les réactifs spécifiques sont limités par rapport au modèle murin. Je décris ci-dessous l'emploi de trois récepteurs : DEC205 qui a été le plus utilisé dans la littérature, CD11c et XCR1 que j'ai ciblé dans mon travail expérimental chez le porc.

a. DEC205

DEC205 ou CD205 est un récepteur d'endocytose et une lectine de type c (**Alvarez et al. 2013, revue ; Shrimpton et al. 2009**). Sa partie N-terminale extracellulaire est constituée d'un domaine riche en cystéines, d'une fibronectine de type II, dix domaines de reconnaissance de motifs glucidiques et une séquence d'internalisation intra-cytosolique. Chez la souris, il est préférentiellement exprimé par les DC CD8 α ^{pos} (cDC1) et son ciblage facilite la cross-présentation antigénique aux lymphocytes T. Il est également exprimé par les DC épithéliales thymiques, les DC dermales et les LC (**Kurts, 2008**). Il a été caractérisé chez différents animaux dont la souris, le mouton, la chèvre ainsi que le porc (**Alvarez et al. 2013, revue**). Il reconnaît de multiples ligands, sans grande spécificité, incluant les CpG de type B (**Lahoud et al. 2012**). C'est un des récepteurs les plus utilisés pour l'APC-targeting dans

différents modèles animaux depuis 1995 (**Alvarez et al. 2013, revue**), en vaccination protéique ou à ADN. Des niveaux sans précédent de réponses T CD8^{pos} et Th1 ont été induits par le ciblage de ce récepteur (**Idoyaga et al. 2011**).

Par exemple des souris immunisées par IM et EP avec un vaccin à ADN codant un ScFv-anti-DEC205 fusionné à un antigène GAG p41 du VIH ont développé de plus fortes réponses lymphocytaires T IFN γ CD4^{pos} et CD8^{pos} et humorales spécifiques que si elles étaient immunisées avec l'antigène non ciblé (**Nchinda et al. 2008**). De plus, elles ont montré une protection renforcée vis à vis d'un challenge intranasal avec un virus de la vaccine codant pour GAG p41. Un même type de bénéfice a été obtenu avec le ciblage d'antigènes tumoraux (**Cao et al. 2013**), et d'autres antigènes viraux (influenza, **Niezold et al. 2015**).

Dans un autre travail, des veaux ont reçu une dose de vaccin à ADN codant un ScFv-anti-DEC205 fusionné à un antigène *d'Anaplasma marginale*, à CD40L et au FLT3L. Ils ont présenté des réponses lymphocytaires T CD4^{pos} prolifératives et sécrétrices d'IFN γ , ainsi qu'une réponse humorale, supérieure à celles obtenus chez des veaux immunisés avec un vaccin à ADN codant l'antigène seul (**Njongmeta et al. 2012**). Récemment, une étude clinique en phase I (**NCT01834248**) a montré à la fois l'induction d'une réponse humorale spécifique et lymphocytaire IFN γ chez des patients atteints de différents cancers après l'injection d'un anti-DEC205 fusionné à l'antigène NY-ESO-1 présent sur des cellules tumorales, en présence d'adjuvants (**Dhodapkar et al. 2014**).

b. CD11c

CD11c est un récepteur de type I de la famille des intégrine (**Uotila et al. 2013**). Il est composé d'une chaîne αX et de l'intégrine $\beta 2$ (ou CD18). C'est le récepteur du complément 4 (**Kurts, 2008**). Il est exprimé par les cellules myéloïdes comprenant les macrophages, les monocytes, les DC ou encore les cellules NK. Il interagit avec différents ligands comme des molécules d'adhésion ICAM-1 ou ICAM-4, des protéines du complément comme iC3b, des protéines de matrice comme le fibrogène ou le collagène, ou bien avec des composants bactériens comme le LPS (**Sadhu et al. 2007**). Il joue un rôle dans la capture des antigènes, notamment quand opsonisés par le complément, et dans la présentation d'antigène. Son expression par une large sélection de cellules myéloïdes fait de CD11c un candidat intéressant pour l'APC-targeting. Certains travaux indiquent que le ciblage de CD11c serait plus efficace que celui de DEC205 pour induire les réponses lymphocytaires T CD4^{pos} et CD8^{pos} (**Kurts,**

2008). Des souris immunisées avec un vaccin à ADN codant un ScFv-anti-CD11c murin fusionné avec un antigène tumoral HER/2neu administré par IM+EP ont induit une réponse cytotoxique anti-tumorale, et en combinaison avec du cyclophosphamide pour éviter l'induction de lymphocytes T régulateurs, la vaccination retarde significativement le développement des tumeurs (**Wang et al. 2015**). Enfin, le ciblage de CD11c sur des cDC2 humaines in vitro, en lien avec le routage endocytaire du récepteur dans des compartiments précoces, s'est révélé très efficace pour la présentation croisée d'antigènes aux lymphocytes T CD8^{pos}; ainsi le ciblage de ce récepteur permettrait aux antigènes de sortir de l'endosome précoce et de suivre la voie de présentation du CMH class I, dans des non-cDC1, au moins chez l'homme (**Cohn and Delamarre, 2014**).

Nous avons utilisé chez des porcs la stratégie de l'APC-targeting en ciblant CD11c : soit en vaccinant contre un virus influenza A avec un complexe anticorps-antigène reliés par une liaison non covalente de type biotine-streptavidine, soit en immunisant contre le PRRSV-1 avec des vaccins à ADN codant des VB-ScFv-anti-CD11c fusionnés à différents antigènes du PRRSV-1 (résultats présentés dans les **articles 1 et 3** respectivement).

c. XCR1

XCR1 ou XC-chemokine receptor 1 appartient à la superfamille des protéines G (**Lei and Takahama, 2012, revue**). Il est constitué de sept domaines transmembranaires et de nombreux acides aminés conservés. Il est exclusivement exprimé par les cDC1 et aucune autre cellule du système hématopoïétique. Son expression sélective sur les cDC1 est conservée chez les mammifères tels que la souris, l'homme, le singe, le mouton ou encore le porc (**Deloizy et al. 2016**). L'interaction avec son ligand XCL1 (XCL1 et XCL2 chez l'homme) entraîne une augmentation d'ions calcium intracellulaires (**Lei and Takahama, 2012, revue**). XCL1 est sécrété par les lymphocytes T CD8^{pos} et les cellules NK. L'interaction XCR1/XCL1 stimule la différenciation des lymphocytes T CD8^{pos} en lymphocytes T cytotoxiques (cf. partie III.B.1.a.iii.). Son exclusivité d'expression par les cDC1 fait de XCR1 un candidat idéal pour le DC-targeting. Des souris immunisées avec des constructions XCL1-OVA ou anti-XCR1-OVA co-injectés avec du LPS comme adjuvant, présentent des réponses lymphocytaires T CD4^{pos} et CD8^{pos} cytotoxiques nettement supérieures à celles induites par l'OVA non ciblée (**Hartung et al. 2015; Terhorst et al. 2015**). Des souris immunisées avec un vaccin à ADN codant un VB-HA-XCL1 (HA du virus

influenza) ont présenté de fortes réponses lymphocytaires T CD8^{pos}, Th1 CD4^{pos} et humorales à IgG2a, supérieures à celles induites par des VB non ciblés, (**Fossum et al. 2015**). Par ailleurs, des VB-HA-XCL1 capables d'internalisation ralentie en jouant sur des interactions XCL1-XCR1 inter-spécifiques ont induit des réponses anticorps très élevées, plus élevées que celle de VB rapidement internalisés ou non ciblés. L'hypothèse proposée est que les cDC1, bien que plus spécialisées en induction de réponse lymphocytaire T CD8^{pos}, ont pu servir de plateforme de stimulation entre lymphocytes T helper folliculaires et lymphocytes B grâce à la présence plus longue des VB-HA-XCL1 à leur surface, alors que des VB-HA-XCL1 rapidement internalisés seraient plus favorablement dirigés vers une présentation CMH class I (**Gudjonsson et al. 2017**). Ce phénomène pourrait expliquer certains de nos résultats présentés dans les **articles 3 et 4** dans lesquels nous avons immunisé et vacciné des porcs avec des vaccins à ADN codant des VB-XCL1 fusionnés avec différents antigènes du PRRSV-1.

3. Adjuvants

Pour que le DC-targeting stimule des réponses lymphocytaires T cytotoxiques et Th1, il faut activer les DC. En effet, si les DC sont à leur état basal de contrôle de la tolérance, leur ciblage conduit à une réponse de type tolérogène (**Hawiger et al. 2001**).

Ainsi co-administrer l'antigène ciblé avec un adjuvant comme le poly I:C (TLR3) ou le CpG (TLR9) ou un anticorps anti-CD40 s'est révélé indispensable pour obtenir un bénéfice du DC-targeting, notamment en ce qui concerne les réponses lymphocytaires T (**Radford and Caminschi, 2013**). Toutefois pour amplifier les réponses B par le DC-targeting, l'emploi d'adjuvant n'est pas toujours nécessaire, notamment lorsque l'outil vaccinal comprend des épitopes T forts (**Li et al. 2015 ; Caminschi et al. 2008**). Parfois même l'emploi d'adjuvant masque l'effet du DC-targeting sur la réponse B (**Li et al. 2015**). Ce point sera utilisé pour le choix de nos stratégies d'emploi d'adjuvants dans l'**article 1**.

Dans la partie III.C.2. concernant la vaccination à ADN, nous avons indiqué que les méthodes d'administration d'ADN par électroporation induisent une réponse tissulaire ayant un effet adjuvant. Ainsi certains modes d'immunisation à ADN avec antigène ciblé ne semblent pas nécessiter d'adjuvant additionnels pour voir un bénéfice du ciblage dans l'induction des réponses lymphocytaires T effectrices (IFN γ , cytotoxiques) (**Baranowska et al. 2015 ; Fossum et al. 2015 ; Nchinda et al. 2008**). Toutefois l'emploi d'adjuvants complémentaires pourrait avoir un intérêt. Des adjuvants génétiques, codés par des plasmides

co-injectés, sont connus pour augmenter l'efficacité de la vaccination à ADN en général, par exemple le CD40L, ICAM-1, IL-12, IL-15 ou encore le GM-CSF. Les cellules transfectées avec le plasmide codant l'adjuvant le sécrètent dans le site d'injection stimulant les APC résidentes et les cellules des ganglions lymphatiques drainants (**Suschak et al. 2017, revue**).

Le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) est une cytokine adjuvant particulièrement efficace pour activer les lymphocytes T (**Somasundaram et al. 1999**) pour induire les lymphocytes T CD8^{pos} et pour recruter les APC au site d'immunisation (**Li and Petrovsky, 2016 ; Chen et al. 2014**). Il a été démontré comme efficace à de nombreuses reprises (des centaines de références), par exemple dans les vaccinations à ADN contre Pseudorabies virus (**Yoon et al. 2006**) ou la Dengue (**Lu et al. 2013**). Par contre certains travaux montrent que ses effets sont divers et imprédictibles: lors d'immunisation à ADN contre différents flavivirus, des effets positifs ou négatifs sur la réponse immune ont été obtenus (**Chen et al. 2014**). De même, de fortes doses de GM-CSF dans le cadre d'une vaccination avec un vecteur codant pour des antigènes du SIV chez le macaque ont fortement réduit les réponses muqueuses à IgA (**Chen et al. 2014**).

Nous avons employé cet adjuvant génétique dans l'**article 2** où nous avons évalué l'efficacité immunogène de différents modes d'administration de vaccins à ADN codant pour des antigènes du PRRSV-1.

Objectifs de thèse

IV. Objectifs

L'objectif général de ma thèse est d'évaluer l'efficacité du ciblage des antigènes vaccinaux vers les cellules présentatrices d'antigènes (APC), ainsi que l'effet du mode d'administration de vaccins protéiques et à ADN sur les réponses immunes chez le porc. Les antigènes vaccinaux sont des antigènes conservés des virus influenza et des PRRSV, qui visent à induire une protection large contre ces virus pour lesquels des variants viraux apparaissent constamment.

Objectif 1 :

Évaluer l'impact des voies d'injection d'antigènes conservés entre souches, dirigés ou non vers les APC, dans la protection contre le virus influenza chez le porc (article 1).

Dans une première partie que je propose en préambule aux travaux principaux, j'ai évalué l'impact de la voie d'injection d'antigènes protéiques conservés, ciblés ou non vers les cellules dendritiques chez le porc. Il s'agissait d'un programme ANR-Blanc International avec le Mexique (2012-2016) ayant l'acronyme « DCskinVacFlu » dans lequel je fus très impliquée et dont je suis co-premier auteur d'un article publié (**Bernelin-Cottet, Deloizy et al. 2016**). Le virus influenza est endémique en élevage porcin, et il induit des symptômes proches de ceux observés chez l'homme. Ce virus co-existe fréquemment avec le virus du PRRS dans les élevages.

Objectif 2 :

Évaluer l'efficacité de stratégies d'administration de vaccins à ADN et du ciblage des antigènes aux APC pour induire des réponses lymphocytaires T étendues, efficaces contre des souches hétérologues du PRRSV-1 (articles 2 à 4).

Mon sujet principal de thèse est financé par le projet européen SAPHIR (Strengthening Animal Productions and Health through Immune Responses) coordonné par Isabelle Schwartz-Cornil dans le cadre du programme Horizon 2020 (2015-2019). L'objectif de SAPHIR est de développer des stratégies vaccinales innovantes contre différents agents pathogènes responsables de pertes économiques majeures dans les élevages porcins, bovins et avicoles. Il implique différents partenaires privés et publics (27 laboratoires), européens (12 pays) et chinois de différentes disciplines (pathologistes, microbiologistes, économistes, sociologues, généticiens...). Au cours de ma thèse, j'ai pu interagir avec des partenaires

suisses, belges, hollandais, norvégiens, irlandais et espagnols et j'ai participé à toutes les réunions annuelles du consortium de 2016 à 2019.

L'immunité protectrice contre le PRRSV implique des anticorps neutralisants qui sont dirigés contre des motifs antigéniques variables des protéines d'enveloppe et qui sont efficaces contre les souches homologues, mais peu efficaces contre les souches hétérologues, conduisant à un échappement vaccinal sur le terrain. Néanmoins, la plupart des nouvelles stratégies vaccinales sont conçues pour induire des anticorps neutralisants. Toutefois, l'immunité protectrice anti-PRRSV est également observée en absence d'anticorps neutralisants et la réponse lymphocytaire T est alors proposée comme étant impliquée dans la protection. En effet comme présenté dans l'introduction, des travaux indiquent que la réponse lymphocytaire T IFN γ serait corrélée à la réduction de la charge virale. À la différence des anticorps neutralisants, les lymphocytes T effecteurs peuvent être dirigés contre des antigènes internes ou non structuraux, souvent plus conservés entre souches que les antigènes externes, et le récepteur T présente une certaine tolérance à la mutation d'épitopes, tant que la charge électrique et la forme globale des complexes CMH/peptides sont préservées. De plus, des protéines virales présentant des épitopes T conservés entre souches du PRRSV-1 ont été identifiées (nsp1 β , RdRp, M, nsp5). Ainsi, nous avons cherché à développer un « T cell vaccine » en utilisant la stratégie de la vaccination à ADN, connue pour être particulièrement efficace dans l'induction de réponses lymphocytaires T. Nous avons cherché à optimiser la stratégie d'injection de ces vaccins à ADN ainsi que ciblage des antigènes vers les cellules dendritiques pour générer des réponses lymphocytaires T les plus élevées et étendues possibles (c'est-à-dire reconnaissant le maximum d'antigènes viraux) dans le but de générer un vaccin efficace en protection hétérologue chez le porc. Ainsi, trois sous-objectifs seront présentés sous forme de trois articles.

Sous Objectif 1 : Optimisation de la stratégie d'administration des vaccins à ADN chez le porc pour induire des réponses lymphocytaires T.

Sous Objectif 2 : Effet du ciblage des antigènes du PRRSV-1 aux APC sur les réponses immunes T et B induites par des vaccins à ADN, seuls ou associés à un vaccin atténué en prime-boost.

Sous Objectif 3 : Évaluation de la protection hétérologue induite par la stratégie vaccinale la plus prometteuse identifiée dans les sous objectifs 1 et 2.

Résultats

V. Résultats

Article n°1 : « Un vaccin influenza universel peut conduire à une exacerbation de la maladie ou à un contrôle viral selon la voie d'injection »

impact factor in 2016 : 6,429

Les virus influenza A sont responsables d'épidémies saisonnières et ils représentent une menace majeure liée au risque imprévisible de pandémie mondiale dues à des virus mutants et/ou réassortants susceptibles de passer de l'animal à l'homme. Les virus influenza affectent en particulier les oiseaux et le porc qui est sensible aux virus humains et aviaires, et est considéré comme un potentiel hôte de mixage. En 2009, l'émergence de la souche influenza A H1N1 (H1N1pdm09), d'origine porcine, humaine et aviaire, entraîna une pandémie, mais les vaccins commercialisés ont montré une efficacité limitée. En raison des évolutions constantes des souches, dans le but de réduire le risque de transmission zoonotique et les coûts économiques de l'infection dans les industries porcines, le développement d'un vaccin universel est souhaitable.

Dans cet article, nous avons essayé de développer un vaccin protéique avec des antigènes (AG) candidats conservés inter-souches, évalué chez le porc. Des protéines virales ont été fusionnées à la streptavidine (SA-AG) et exprimées en bactéries: la nucléoprotéine (SA-NP), l'ectodomaine de M2 (SA-M2e), la tige de l'hémagglutinine (SA-HA2) ou une chimère HA2-SA-M2e (Equipe de Peter Sebo, Pragues). Le vaccin protéique, grâce à la SA été combiné à un anticorps biotinylé, dirigé aux cellules présentatrices d'antigènes (APC), dans une stratégie d' « APC-targeting ». Nous avons choisi de cibler le CD11c, récepteur exprimé par les cellules dendritiques conventionnelles et par les monocytes/macrophages chez le porc. L'assemblage des SA-AG et les anticorps biotinylés est appelé vaccicomplexe (VC).

Nous avons montré que les VC, assemblés extemporanément grâce à la liaison de haute affinité entre streptavidine et biotine (10^{-15} M) interagissent avec les cellules CD11c^{POS} de la peau de porc. Nous avons immunisé dans un premier temps 36 porcs âgés de 3 - 4 mois répartis en six groupes avec des VC ciblés au CD11c, des VC non ciblés (anticorps irrelevant de même isotype) et avec les SA-AG seuls, par la voie ID, en présence ou non de CpG, seul adjuvant de type ligand de TLR ayant été déjà évalué chez le porc au préalable. Les adjuvants huileux ne semblaient pas souhaitables car ils perturbent le ciblage (montré par l'équipe). Nous avons observé l'induction de réponses humorales IgG anti-NP et anti-HA2 mais pas anti-M2e, et l'induction de réponses cellulaires IFN γ anti-NP. Nous avons montré que le CpG apporte un bénéfice mineur dans nos conditions d'étude. Par contre, aucun bénéfice du ciblage au CD11c n'a été observé. Nous avons choisi d'immuniser par ID car le derme est riche en APC. Toutefois, les protéines, ciblées ou non, injectées en grande quantité dans un petit volume dans le derme, ont pu être capturées efficacement par les APC résidentes, ne conférant ainsi pas davantage au ciblage. Nous avons donc immunisé dans un second temps

40 porcs âgés de 2 mois répartis en cinq groupes avec les VC SA-NP, SA-HA2 et SA-M2e, ciblés et non ciblés au CD11c, sans adjuvant. En effet, des études chez le singe avaient montré que l'adjuvant pouvait masquer le bénéfice de l'APC-targeting, et le CpG utilisé dans la première expérience ne s'était pas montré vraiment efficace. L'IM a induit une réponse humorale anti-M2e et HA2 plus forte que la voie ID, et a permis de montrer un avantage du ciblage au CD11c sur la réponse cellulaire IFN γ anti-NP, à la différence de la voie ID. De plus, suite au challenge par le virus souche H1N1pdm09, l'immunisation par voie IM a conduit à une diminution de l'expression des symptômes, avec réduction de l'excrétion virale dans les sécrétions nasales. L'immunisation par voie ID a conduit à une exacerbation de la maladie. Enfin nous avons montré que la réponse IgG anti-HA2, et à un moindre degré la réponse IgG anti-M2e, est corrélée à la protection, alors que les réponses anti-NP, cellulaire et humorale, ne le sont pas.

Ainsi la méthode d'injection impacte sur les réponses immunitaires induites chez les porcs pouvant influencer sur l'efficacité de l'APC-targeting, la réponse anticorps, la protection ou l'exacerbation de la maladie.

Les immunisations et infections ont été réalisées dans la Plate-Forme d'Infection Expérimentale (PFIE) de Nouzilly en France. Dans ce travail, j'ai réalisé une partie des analyses sérologiques et toute la partie des titrages viraux post-épreuve.



A Universal Influenza Vaccine Can Lead to Disease Exacerbation or Viral Control Depending on Delivery Strategies

OPEN ACCESS

Edited by:

José Mordoh,
Fundación Instituto Leloir,
Argentina

Reviewed by:

Peter Timmerman,
Pepsan Therapeutics B.V.,
Netherlands
María Marcela Barrio,
Fundación Cáncer FUCA,
Argentina

*Correspondence:

Isabelle Schwartz-Cornil
isabelle.schwartz@inra.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

*Present address:

Charlotte Deloizy,
GenoSafe, Evry, France

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular
Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 26 September 2016

Accepted: 12 December 2016

Published: 26 December 2016

Citation:

Bernelin-Cottet C, Deloizy C,
Stanek O, Barc C, Bouguyon E,
Urien C, Boulesteix O, Pezant J,
Richard C-A, Moudjou M,
Da Costa B, Jouneau L, Chevalier C,
Leclerc C, Sebo P, Bertho N and
Schwartz-Cornil I (2016) A Universal
Influenza Vaccine Can Lead to
Disease Exacerbation or Viral Control
Depending on Delivery Strategies.
Front. Immunol. 7:641.
doi: 10.3389/fimmu.2016.00641

Cindy Bernelin-Cottet^{1†}, Charlotte Deloizy^{1††}, Ondrej Stanek², Céline Barc³,
Edwige Bouguyon¹, Céline Urien¹, Olivier Boulesteix³, Jérémy Pezant³,
Charles-Adrien Richard¹, Mohammed Moudjou¹, Bruno Da Costa¹, Luc Jouneau¹,
Christophe Chevalier¹, Claude Leclerc^{4,5}, Peter Sebo², Nicolas Bertho¹ and
Isabelle Schwartz-Cornil^{1*}

¹VIM-INRA-Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, ²Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, v.v.i, Prague, Czech Republic, ³INRA, UE1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, PFIE, Nouzilly, France, ⁴Institut Pasteur, Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France, ⁵INSERM U1041, Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, Département Immunologie, Paris, France

The development of influenza A virus (IAV) vaccines, which elicits cross-strain immunity against seasonal and pandemic viruses is a major public health goal. As pigs are susceptible to human, avian, and swine-adapted IAV, they would be key targets of so called universal IAV vaccines, for reducing both the zoonotic risk and the economic burden in the swine industry. They also are relevant preclinical models. However, vaccination with conserved IAV antigens (AGs) in pigs was reported to elicit disease exacerbation. In this study, we assessed whether delivery strategies, i.e., dendritic cell (DC) targeting by the intradermal (ID) or intramuscular (IM) routes, impact on the outcome of the vaccination with three conserved IAV AGs (M2e, NP, and HA2) in pigs. The AGs were addressed to CD11c by non-covalent binding to biotinylated anti-CD11c monoclonal antibody. The CD11c-targeted AGs given by the ID route exacerbated disease. Conversely, CD11c-targeted NP injected by the IM route promoted T cell response compared to non-targeted NP. Furthermore, the conserved IAV AGs injected by the IM route, independently of DC targeting, induced both a reduction of viral shedding and a broader IgG response as compared to the ID route. Our findings highlight in a relevant animal species that the route of vaccine delivery impacts on the protection induced by conserved IAV AGs and on vaccine adverse effects. Finally, our results indicate that HA2 stands as the most promising conserved IAV AG for universal vaccine development.

Keywords: dendritic cells, swine, influenza, human, vaccine, routes of administration

Abbreviations: IAV, influenza A virus; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; AG, antigen; SA-AG, antigen fused to streptavidin; APC, antigen-presenting cell; BAL, broncho-alveolar lavage; biot-mAb, biotinylated mAb; cDC, conventional DCs; d0, day 0; dpv, day post challenge; dpv, day post vaccination; DC, dendritic cell; DMSO, dimethyl sulfoxide; FCS, fetal calf serum; HRP, horseradish peroxidase; ISC, isotype control; ID, intradermal; IM, intramuscular; mAb, monoclonal antibodies; pDC, plasmacytoid DC; VCs, vaccicomplexes; TMB, tetramethylbenzidine.

INTRODUCTION

Influenza A viruses (IAVs) are responsible of high morbidity and mortality in humans and animals worldwide. Due to constant emergence of antigenic drift variants or novel emerging subtypes, influenza vaccines need to be updated annually. Vaccination with protective antigens (AGs) that are conserved across a broad array of viral variants could mitigate the risks of new pandemic outbreaks. Three conserved AGs could constitute, or be part of, the so called universal flu vaccines: the nucleoprotein NP, the M2e viroporin, and the HA2 stalk domain of the IAV hemagglutinin. NP is among the most important targets for host CD8⁺ T cells (1) and it was shown to afford protection against IAV when provided as a protein vaccine (2), a DNA vector (3), or encoded by heterologous viral carriers (4). M2e is naturally poorly immunogenic in the viral particle. However, when presented in an immunogenic form to the immune system, the M2e AG induces protection *via* anti-M2e IgG that engage Fcγ receptors and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (5, 6). Finally, immunization with the HA2 triggered partial (7) or even full protective immunity (8, 9), also *via* ADCC mechanism. Most of these results with conserved IAV AG were generated in the mouse model, and promising results were also obtained in horses with NP (10) and in ferrets with M2e (6).

Pigs are susceptible to infection with human and avian adapted strains, as well as swine-adapted strains and are supposed to be potential mixing vessels (11). Persons in contact with pigs may become infected with IAV and conversely, they may transmit human IAV to swine. Pigs are proposed to have been involved in the emergence of the pandemic strain of H1N1 influenza virus in 2009, as the progenitors of the viral genes had been circulating in pigs at least for 10 years before transmission to humans (12). Besides its zoonotic and public health impact, IAV is also responsible of high economical losses in the swine industry. Thus, widening the immune protection of pig against IAV with universal vaccines is highly desirable. Pig and human develop similar flu symptoms upon IAV infection and share physiological, anatomical, and immunological properties, which justify pig as a relevant biomedical model to evaluate universal vaccines against IAV. Notably pigs vaccinated by the intradermal (ID) route with DNA vaccines encoding for M2e and NP developed exacerbated disease following challenge (13), raising concerns about the safety of IAV universal vaccines in pigs and, potentially in humans.

Disease exacerbation by vaccines is a major issue encountered not only in the case of vaccination with conserved IAV AGs in pigs, but also observed with split IAV AGs given intranasally in mice with a TLR4 ligand (14) or for other infections, such as the respiratory syncytial virus in human (15). In these instances, as the initial AG presentation process has primed the host for detrimental responses, improving the initial AG presentation step could differently shape the immune response and result in beneficial outcomes. In that respect, AG targeting to dendritic cell (DC) immunoreceptors has been largely documented to influence the type and the magnitude of B and T cell immune responses (16, 17). The molecular DC targeting is usually achieved by endocytic receptor-specific monoclonal antibodies

(mAb) that are covalently linked, or complexed, with AGs. In addition to over 100 promising preclinical studies conducted in mice or *in vitro* using human cells (18), few *in vivo* reports suggest that DC targeting could also be beneficial in large mammals such as in non-human primates, cattle, and pigs (19). In addition, the anatomical site where the DC-targeted AG is delivered could also impact on the shaping of the immune response, given the tissue composition in DC and other interfering cell types and the local specificity of the innate response.

In this work, we assessed whether the delivery of the three conserved IAV AG HA2, M2e, and NP by DC targeting in different anatomical sites could shape the immune response toward protective immunity and avoid disease exacerbation in pigs. We targeted the IAV AG to pig CD11c by generating tetramerized AG fusions to streptavidin that formed tight non-covalent complexes with biotinylated anti-pig CD11c, which we called vaccicomplexes (VCs) (20). This DC-strategy has been successfully used to target the ESAT-6 AG to several mouse immunoreceptors including CD11c and induced significant protection against aerosol-delivered *Mycobacterium tuberculosis* (21). We chose CD11c as it stands as a promising receptor for immunotargeting based on *in vivo* mouse studies and *in vitro* human studies, promoting B and especially T cell responses, including CD8⁺ T cell responses (21–24). We showed that CD11c is highly expressed on swine blood and skin DC and that its pattern of expression on myeloid cell subsets is more similar to the human than to the mouse one, thus making pig a good preclinical model for evaluation of the effect of CD11c targeting (25).

We successfully delivered the three conserved IAV AGs in DC-targeted and non-targeted forms by the ID and intramuscular (IM) routes. We found that the site of VC inoculation had a strong impact on the breadth of immune response and on the clinical and viral outcomes upon infection. The CD11c targeting in the ID route led to disease exacerbation and conversely the IM route, independently of CD11c targeting, favored the antibody response extent to all three AGs and the reduction of viral shedding.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Adjuvant

The anti-porcine CD11c (anti-CD11c, 3A8 clone, IgG1) and an isotype control (ISC) mouse IgG1 (ISC, 3G8 clone, IgG1) have been generated by our laboratory and described in Ref. (25). The anti-M2e mAb (clone 14C2) was from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Affinity-purified polyclonal rabbit anti-NP IgG was purchased from Thermo-Scientific, Rockford, IL, USA and affinity-purified polyclonal rabbit anti-HA2 IgG from Biorbyt (Cambridge, UK). Anti-MHC class II mouse mAb (anti-SLA-DR, MSA3 clone, IgG2a) was purchased from Washington State University (USA). Alexa 647-conjugated goat anti-rabbit IgG, with minimal cross-reactivity against ruminant human and mouse proteins, was bought from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, USA). Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG1 and IgG2a, and Alexa 647-conjugated streptavidin (Invitrogen) were bought from Thermo Fischer Scientific. The mouse anti-swine

IFN γ capture mAb (clone pIFN γ) and the biotinylated anti-swine IFN γ (clone PAN) were bought from Mabtech (Nacka Strand, Sweden). The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-pig IgG Fc was from Bethyl Laboratories (Montgomery, AL, USA), the HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG were from KPL (Gaithersburg, USA). CpG oligo-dinucleotides (ggTGCGTCGACGCAGggggg) with lower case letters for phosphorothioate linkages and upper case letters for phosphodiester linkages previously shown to be efficient in pigs (26) were bought from Sigma.

Streptavidin-Fused IAV AG, SDS-PAGE, and Western Blot

The open reading frames encoding influenza AGs for NP, M2e, and HA2 from IAV sequences of the human A/PARIS/2590/2009 (H1N1) pandemic virus were fused in frame to the 3' end of a codon-optimized synthetic gene encoding residues 13–139 of streptavidin from *Streptomyces avidinii* (see **Figure 1A**) (20). The entire coding sequence of the NP gene was PCR-amplified from the cDNA template using specific primers NPfor (5'-TAGCTAGCACTAGTAGTGACATCGAAGCCATGG-3') and NPprev (5'-TACTCGAGCTAGAATTCAGTGCATACTCCTCTGCAT-3'). Codon-optimized "Strings™ DNA Fragments" (Thermo Fisher Scientific) synthetic genes were used to clone the genes encoding residues 76–130 of HA2 (RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSN VKNLYEKVRSQKNNNA), or encoding three consecutive copies of the M2e (3M2e) AG (SLLTEVETPTRSEWESRSDSSDAAASLLT EVETPTRSEWESRSDSSDAAASLLTEVETPTRSEWESRSDSSDAAASLLT) where cysteines 17 and 19 of the original sequence have been replaced by serine residues (underlined), to improve immunogenicity and avoid unwanted disulfide bounds in the chimera, based on previously published works (27, 28). The sequence-confirmed AG fused to streptavidin (SA-AG) fusion proteins were produced in *Escherichia coli* Bl21 λ DE3 at 37°C following IPTG induction (0.5 mM). The proteins were extracted by solubilization of washed inclusion bodies with 8 M urea in 50 mM Tris-Cl pH 8 (loading buffer) and the extracts were loaded onto DEAE Sepharose columns. Upon washing of the resin with 10 bed volumes of the loading buffer, the proteins were eluted by a gradient of 2–250 mM NaCl in loading buffer. Fractions containing SA-AG proteins were pooled, diluted fourfold with 50 mM Tris-Cl pH 8, 1 M NaCl (TN buffer), and loaded onto Phenyl Sepharose columns equilibrated in TN buffer. The resin with bound proteins was washed with 10 bed volumes of the TN buffer and the endotoxin contamination was removed by washing with 10 bed volumes of 60% of isopropanol in the TN buffer. Finally, the denatured monomeric SA-AG fusion proteins were eluted with 8 M urea in 50 mM Tris-Cl pH 8. The Phenyl Sepharose and endotoxin removal step was repeated once to reduce the amount of residual endotoxin below <800 EU/mg of SA-AG protein for all AGs. Purified proteins were then dialyzed against 50 mM ammonium carbonate pH 8.9 in order to form soluble and stable tetramers, as verified by SDS-PAGE analysis (**Figure 1B**). The final tetrameric forms of the SA-AG fusion proteins were stored at 4°C for several days or at –80°C for several months.

Purity and long-term stability of the final AGs were controlled using the Tris-Tricin SDS-PAGE gel separation with Coomassie staining (**Figure 1B**). Protein concentration was determined by the Bradford assay using BSA as calibration standard and tetrameric state of the SA-AG proteins was systematically verified by SDS-PAGE before immunization. The antigenicity of the SA-AG was analyzed by Western blot after under reducing conditions (**Figure S1** in Supplementary Material). The M2e-nucleoprotein carrier from the respiratory syncytial virus was used as a positive control (28). After transfer onto nitrocellulose membrane, the blots were blocked in PBS 0.3% Tween 20 and 5% non-fat dry milk, and respectively, reacted with mAb anti-M2e (0.3 μ g/ml), rabbit polyclonal IgG anti-NP (0.3 μ g/ml), or anti-HA2 (5 μ g/ml), followed by washing and decoration with HRP-conjugated anti-mouse IgG (1/10,000) or HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/10,000), respectively. Control blots with irrelevant primary antibodies were performed to control for specificity. Detection was performed using enhanced chemiluminescence kit (ECL, Thermo Fischer).

Recombinant NP Production

NP gene was cloned in the *E. coli* expression vector pET22b+ (Novagen) between the *Eco*RI and *Xho*I restriction sites, leading to the expression of C-terminal His₆ fusion protein. The gene coding for NP A/PARIS/2590/2009 (H1N1) was amplified with gene-specific primers (sequences available upon request) using A/PARIS/2590 genetic reverse system plasmid as a template. The sequence of the gene was confirmed by nucleotide sequencing. Competent BL-21 Rosetta cells (Stratagene) transformed with the pET22-NP-HisTag plasmid were cultured to an A₆₀₀ of 0.6 in L medium. To express NP, the transformed cells were incubated overnight at 28°C in 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside with agitation. NP purification was purified as previously described (29). Briefly, after centrifugation, the bacterial pellet was resuspended in the lysis buffer, incubated on ice for 1 h, sonicated, and treated with benzonase for 30 min at room temperature. The lysate was clarified by centrifugation for 30 min at 10,000 \times g at 4°C, and the supernatant was collected and loaded on a Hitrap-IMAC column using the AKTA Purifier-100 FPLC chromatographic system (GE Healthcare). NP-His₆ was purified by IMAC-Ni²⁺ affinity chromatography followed by size-exclusion chromatography using a Superdex S200 column and Tris 20 mM pH7.4, NaCl 50 mM buffer. After purification, the purified protein were subjected to 12.5% SDS-PAGE analysis and detected by Coomassie brilliant blue staining. The purified NP concentration was determined by the extinction coefficient $\epsilon = 57,691.31 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm.

Biotinylated mAb and VCs Formation

Protein G-purified anti-CD11c and ISC mAbs were biotinylated (2:1 ratio) using the EZ-Link Sulfo-NHS-LC kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Free biotin was removed by dialysis and the antibody solutions in PBS were sterilized by filtration through 0.2 μ m filters. VC were allowed to form on ice 30 min before use, by incubating the biotinylated mAb (biot-anti-CD11c and biot-ISC) with a two times molar quantity of SA-AG.

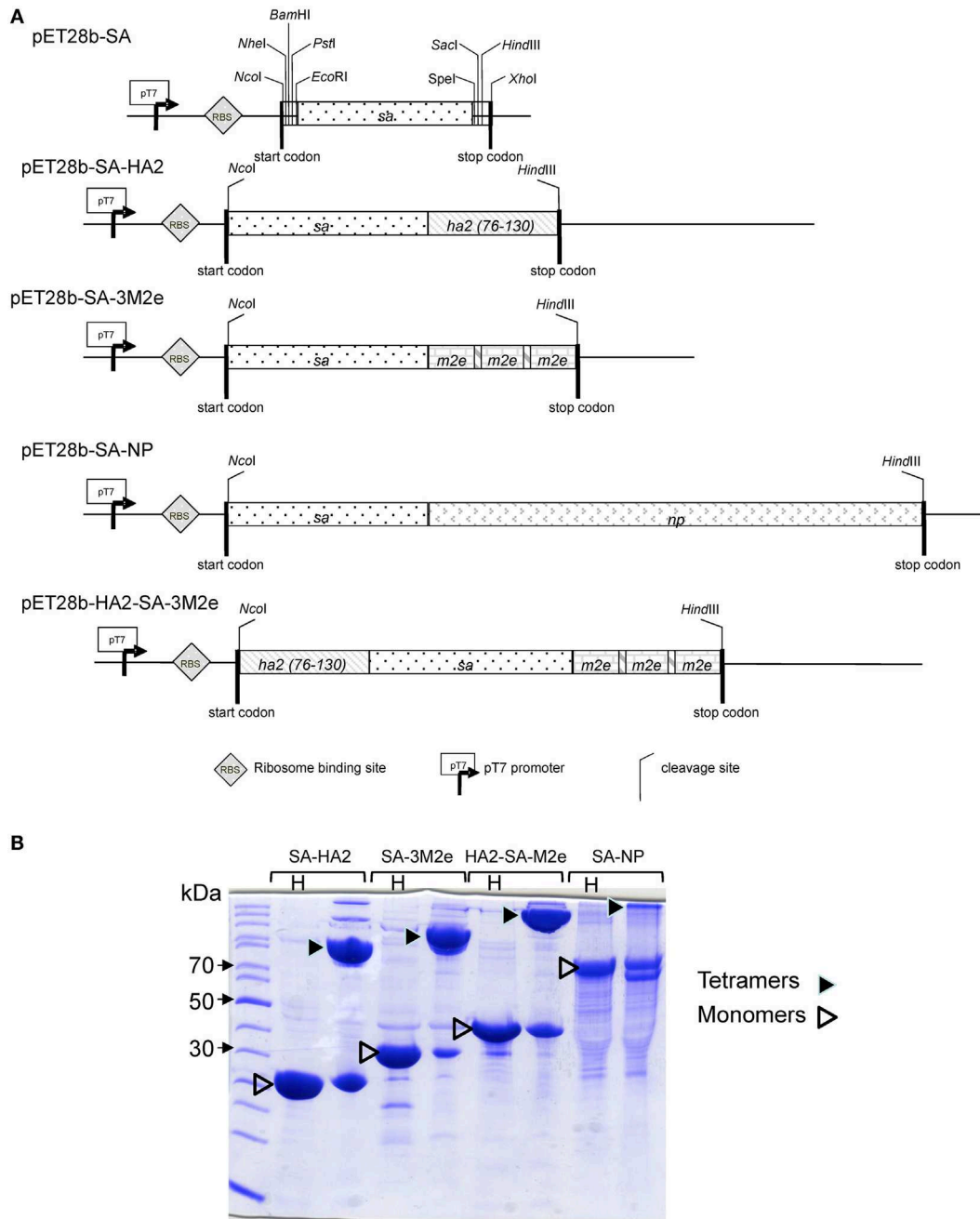


FIGURE 1 | SDS-PAGE migration of tetrameric SA-HA2, SA-M2e, SA-NP, and HA2-SA-M2a proteins. (A) Schematic depiction of the various pET28b-AG fused to streptavidin (SA-AG) expression constructs. **(B)** SDS-PAGE analysis of the purified soluble and heat-denatured (H) monomers of SA-AG fusion proteins of their native tetramers formed upon dialysis against 50 mM ammonium carbonate pH 8.9. The proteins were separated by Tris-Tricine SDS-PAGE and were visualized by Coomassie blue staining. The tetramers were disrupted by sample heating at 100°C for 5 min (H).

Production of the Influenza Challenge Virus

The human-derived A/PARIS/2590/2009 (H1N1) pandemic virus was provided by the National Influenza Center (Northern-France) at the Institut Pasteur, Paris. As previously described, the eight genomic segments of influenza A/PARIS/2590/2009 (H1N1)

were amplified with gene-specific primers and cloned into a bidirectional transcription plasmid derived from pRF483 plasmid (30) to generate recombinant viruses. All plasmids' inserts were verified by nucleotide sequencing. The method used for production of the recombinant A/PARIS/2590/2009 (H1N1) virus was adapted from previously described reverse genetics procedures

(31). Briefly, a subconfluent coculture of 293T and MDCK cells in a 35-mm dish was transfected with the eight pRF483 plasmids (0.5 µg of each), using 10 µl of Fugene HD transfection reagent (Roche). After 24 h of incubation at 37°C, the culture medium was removed, and the cells were further incubated for a 48-h period at 37°C in DMEM supplemented with a reduced 2% concentration of fetal calf serum (FCS). The efficiency of reverse genetics was evidenced by a virus-induced cytopathic effect on MDCK cells and further confirmed by titration on MDCK cells. The working stocks of the recombinant viruses were prepared by two successive amplifications in MDCK cells at a multiplicity of infection (MOI) of 10^{-3} for 3 days at 35°C in MEM. Virus titer was determined on MDCK cells using plaque assay procedure as previously described (28). The A/PARIS/2590/2009 (H1N1) viral production and titration was performed in the BSL3 facilities of the VIM-INRA laboratory in Jouy-en-Josas, France.

Animals and Immunization Experiments

The animal experiments were approved by the French ethical committee #19, i.e., the Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Val de Loire, under the number 00783.02 in accordance with national guidelines on animal use. The animal experiments were done at the Plate-Forme d'Infection Expérimentale PFIE-INRA, Nouzilly, France, under the accreditation number for animal experimentation C37-175-3. The immunization and challenge parts were performed under A-BSL1 and A-BSL3 containment, respectively. Large-white pigs were obtained from the INRA conventional breeding unit Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière PAO-INRA, Nouzilly, France.

In the case of experiment 1, pigs (3–4 months of age) were randomly assigned into six groups of six pigs each (half males, half females). Half of the groups received the protein vaccines only, and the other half received the protein vaccines plus CpG (500 µg per injection) at day 0 (d0) and 30 days post first vaccination (dpv), *via* the ID route, in the inguinal area, under general anesthesia (2 mg/kg xylazine and 10 mg/kg ketamine en IM). The protein vaccine groups include the following: (i) one group vaccinated with CD11c-VC-NP (left side) and CD11c-VC-HA2-M2e (right side), (ii) one group vaccinated with ISC-VC-NP (left side) and ISC-VC-HA2-M2e (right side), and (iii) one group with the uncomplexed SA-NP (left side) and HA2-SA-M2e (right side). The VC were preformed for 1 h at 4°C and each pig dose included 50 µg biot-mAb and SA-AG at a 2 M ratio, i.e., 195 µg SA-NP and 100 µg HA2-SA-M2e in a 400 µl volume. The same amounts of uncomplexed SA-AG in a 400 µl volume were used in the corresponding group. Four 100 µl ID spots were injected per vaccine type. Serum samples were collected by jugular venipuncture at d0 and 55 dpv. Pigs were euthanized 55 dpv, and the spleen cells were harvested. In the course of the experiment, one pig died post anesthesia, in the CD11c-VC + CpG group and one in the ISC-VC + CpG group.

In the case of experiment 2, pigs (2 months of age, mix of males and females) were assigned in five groups of eight or nine animals. One group remained non-vaccinated (eight pigs). Two groups received CD11c-VC-NP (left side) and CD11c-VC-HA2 + CD11c-VC-M2e (right side) either ID (eight pigs) or intramuscularly (IM, nine pigs) at d0 and 50 dpv. Two other

groups received IS-VC-NP (left side) and ISC-VC-HA2 + ISC-VC-M2e (right side) either ID (eight pigs) or IM (nine pigs). In that case, the VC dose included 50 µg biot-mAb and SA-AG at a 2 M ratio, i.e., 195 µg SA-NP, 85 µg SA-M2e and 81 µg SA-HA2 in a 400 µl volume. Serum was collected at d0 and 75 dpv.

Viral Challenge

At 75 dpv in experiment 2, pigs were anesthetized and were challenged by the intratracheal route with 6×10^6 PFU pandemic (H1N1) 2009 virus in 5 ml RPMI in the A-BSL3 facilities of the PFIE-INRA facilities in Nouzilly, France. Appropriate equipment was used to protect the personal (ventilated helmets, protective coverall clothing, gloves, and safety shoes). Nasal swabs were collected daily from day 0 to 8 post challenge (dpc) in 500 µl RPMI and immediately frozen at -80°C . Body temperature was monitored by sensor chips placed under superficial skin muscle. Pigs were examined daily and monitored for dyspnea, coughing, nasal discharge, and conjunctivitis. The last two symptoms were the most frequently observed. As there were no obvious differences in symptom intensities across pigs, we established daily clinical scores by the number of observed symptoms over 8 dpc. The global clinical scores correspond to the sum of the daily clinical scores over the 2–8 dpc period.

Virus Titration

The nasal swab samples were thawed and vortexed for 15 s, centrifuged for 10 min at $600 \times g$ and 100 µl of supernatant were titrated by 10-fold dilutions using plaque assays in MDCK cells at 37°C as described (32).

Ab ELISA

Individual pig sera were assayed for NP, HA2, and M2e-specific IgG by ELISA. Microtiter plates (Immulon 2HB; Thermo LabSystems) were coated overnight at 4°C with 200 ng peptide (M2e, HA2) or 200 ng recombinant NP per well in 100 µl of PBS. Plates were saturated with 5% FCS in PBS—0.05% Tween 20 for 1 h at 37°C. Samples were threefold serially diluted starting at 1:30 and were incubated for 2 h at 37°C. AG-bound antibodies were detected using HRP-conjugated goat anti-pig IgG Fc (Bethyl Laboratories, Montgomery, AL, USA) at 10 ng/ml, incubated for 1 h at 37°C. ULTRA-tetramethylbenzidine substrate (TMB, Thermo-Scientific) was used for the HA2 and M2e ELISA, and regular TMB for the NP ELISA. Absorbance was measured at 450 nm and the results were expressed as endpoint antibody titers, calculated by regression analysis plotting dilution versus A_{450} . Endpoint titers were calculated as the highest dilution giving twice the absorbance of the negative control.

Isolation of PBMC, Splenocytes, Migrated Cells from Skin Explants, and Alveolar Macrophages

Pig blood was collected on 1.3 M citrate and mononuclear cells were isolated on Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham Bioscience) and used fresh. Spleen cells were isolated by

mechanical dissociation followed by filtration on successive 500 μm and 100 μm mesh-sized nylon filters and centrifugation on Ficoll-Hypaque density gradient. Spleen cells were step frozen in FCS + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored in liquid nitrogen. Migrated cells from pig skin explants were obtained from 24 punch biopsies (8 mm), which were floated for 24 h on 10 ml RPMI 1640 medium + 10% FCS and antibiotics. Migrated cells were collected after loading on a 100 μm mesh-sized nylon filter and used fresh. Alveolar macrophages were collected as described, step frozen in FCS + 10% DMSO, and stored in liquid nitrogen (33). Broncho-alveolar lavage (BAL) was performed twice on isolated left lung with 250 ml PBS + 2 mM EDTA and the collected cells were step frozen and stored in liquid nitrogen.

Flow Cytometry

Pig BAL cells or migrated cells from pig skin biopsies were incubated for 30 min on ice in saturation buffer made of PBS supplemented with 5% horse serum and 5% swine serum. For analysis of biot-anti-CD11c binding on BAL cells, biot-anti-CD11c and biot-ISC were used at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ followed by Alexa 647-conjugated streptavidin. For labeling with VC, VC were first made on ice, and VC corresponding to 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biot-mAb + 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SA-NP were added on the cells for 30 min. The cells were then washed and successively incubated with rabbit anti-NP IgG and anti-MHC class 2 (anti-SLA-DR, MSA3 mAb, IgG2a, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and followed by highly specific Alexa 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG2a (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Dead cells were excluded by DAPI labeling. Flow cytometry acquisition was done with a Becton Dickinson Fortessa Flow cytometer and the acquired data were analyzed using FlowJo software (version X.0.6, Tree Star).

T-Cell Restimulation with Recombinant NP

In experiment 1, spleen cells were thawed from frozen stocks and dead cells were removed on optiprep gradient. In experiment 2, PBMC were used fresh. In both cases, cells were resuspended at a 10×10^6 cells/ml concentration in X-vivo medium (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) supplemented with 2% FCS and penicillin/streptomycin and cultured in 96-well plates for 72 h either in medium alone, with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ConA or with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ recombinant NP.

IFN γ ELISA

The culture supernatants from the T cell restimulation assay were tested as duplicates in a IFN γ swine ELISA as recommended by the supplier (Mabtech), using 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ capture mAb, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biot-anti-IFN γ and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HRP-streptavidin. Regular TMB was obtained in experiment 1 and ULTRA-TMB in experiment 2. The OD values were obtained at 450 nm. The net OD values were calculated as (mean of the OD from duplicated wells + NP) – (mean of the OD from duplicated wells in plain medium).

Statistical Analyses

Data were analyzed with the GraphPad Prism 5.0 software. Paired *t*-tests were used for comparison of antibody responses between

0 and 55 dpv in experiment 1. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test was used for comparison of vaccinated groups against control non-vaccinated group. The correlation analysis between viral shedding and antibody response was done bilateral Spearman test. The principal component analysis (PCA) was done with 12 factors, including viral shedding at 3, 4, 5, 6 dpc, global clinical scores, T cell response at 70 dpv, anti-HA2, anti-M2e, anti-NP Ab response on the day of the challenge, and at 5 dpc. Antibody and viral titer data were log transformed. PCA graphics has been produced using FactoMineR R package (<http://factominer.free.fr/>).

RESULTS

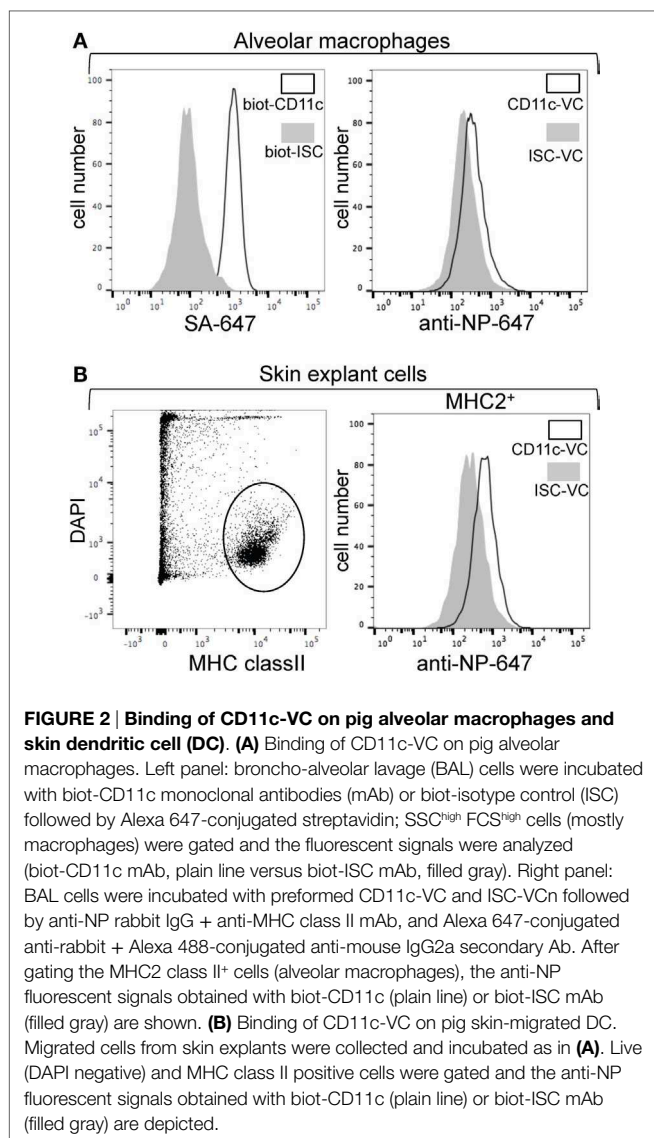
Generation of VCs for Targeting Conserved IAV AG to Swine DC

In order to obtain non-covalent complexes of the AGs with the targeting anti-CD11c antibody, we produced SA-AG protein fusions, where the conserved IAV AG, e.g., NP, three repeated copies of the M2e (3M2e) or the HA2 stem segment were fused to the tetramerizing core of SA, as schematically depicted in **Figure 1A**. Tetrameric forms of purified SA-AG fusion proteins bind biotin-conjugated antibodies to form VC due to the very high affinity of binding interaction between biotin and tetrameric SA (Kd 10^{-15} M). An additional bi-antigenic chimera was next generated by genetically fusing the HA2 AG to the N-terminal and the 3M2e AG to the C-terminal ends of SA, respectively, to yield HA2-SA-3M2e construct, as depicted in **Figure 1A**. All SA-AG fusions proteins (SA-HA2, SA-M2e, SA-NP, and the HA2-SA-M2e chimera) were purified close to homogeneity by combination of ion exchange and hydrophobic chromatography. As shown in **Figure 1B**, the dialyzed SA-AG fusion proteins formed stable tetramers that were stable in SDS-PAGE, unless heat-denatured (H) prior to loading. The four SA-AG fusion constructs were recognized by the specific antibodies directed to IAV AGs in Western blot (Figure S1 in Supplementary Material), supporting their expected antigenicity.

We have previously developed an anti-pig CD11c mAb (3A8 clone) and we showed that it reacts with swine myeloid cells in blood and in skin, and preferentially with conventional dendritic cells (cDC) of the cDC2 type and monocyte/macrophages (25). We reasoned that this mAb is suitable for targeting DC with VC in swine. The anti-CD11c and ISC mAb were biotinylated (CD11c-biot and ISC-biot) and the binding of CD11c-biot on alveolar macrophages was confirmed by Alexa 647-SA (**Figure 2A**). Preformed CD11c-VC-NP demonstrated a superior binding to both alveolar macrophages or DCs and macrophages from skin as compared to ISC-VC-NP (**Figures 2A,B**). Thus the VC strategy allows targeting of IAV AG to CD11c on DC in the pig.

Immunogenicity of VC Delivering Conserved IAV AG upon ID and IM Inoculation

As the dermis is rich in CD11c⁺ DC capable to bind targeted VC, we first decided to inject the CD11c-VC, ISC-VC, and the



uncomplexed SA-AG intradermally in pigs (experiment 1). The SA-AG were SA-NP and the HA2-SA-M2e chimera (see Materials and Methods). We also tested the benefit of adding an adjuvant to activate the targeted DC. Mineral or organic adjuvants may interfere with DC targeting, as we observed with the squalene-type of adjuvant (data not shown). Thus addition of a TLR ligand was evaluated. To the best of our knowledge, the only TLR ligands showing *in vivo* adjuvant properties in pigs are CpG oligo-dinucleotides (26). We thus added 500 µg CpG to VC and uncomplexed SA-AG in half of the immunized pigs. The animals were from a conventional breeding unit and thus had significant levels of preexisting Ab against NP and HA2 at the time of vaccination, in line with the fact that a large fraction of the pig population is immune to influenza (34) (Figures 3A–C). All vaccine regimens significantly increased the anti-NP and anti-HA2 IgG levels measured at 55 dpv relatively to d0 ($p < 0.02$ and 0.05 , respectively, paired bilateral

t-test), but not the anti-M2e levels (Figures 3A–C). CpG slightly but significantly improved the anti-NP IgG response and had marginal effect on the anti-HA2 IgG response (Figures 3A–C). CD11c-VC, ISC-VC, and the uncomplexed SA-AG yielded similar efficacy on the antibody response, whether CpG was included or not. There was no differences on the IFN γ response of splenic T cells to NP restimulation at 55 dpv between the different vaccinated groups (Figure 3D). There was no correlation between the preexisting anti-NP and anti-HA2 IgG levels and the measured B and T cell responses to VC and uncomplexed SA-AG, suggesting that preexisting Ab did not interfere on these responses (Figure S2 in Supplementary Material). Thus in our conditions, VC and uncomplexed SA-AG stimulated B and T cell response against NP and HA2 in pigs; however, CD11c targeting did not improve immunogenicity upon ID inoculation.

Since untargeted VC and SA-AG injected in the dermis may already be efficiently captured by the rich network of local DC, the additional targeting to CD11c does not necessarily provide any advantage at the capture step. We thus compared the immunogenicity of VC injected by ID and IM routes in experiment 2, at the end of which pigs were challenged with pandemic (H1N1) 2009 virus. Given the very high cost and logistics issues of such type of large animal experiments, the comparisons of every potential immunogen and routes of immunization were not feasible and we had to select a limited set of vaccine regimens. Therefore, we decided to compare the immunogenicity of CD11c-VC and ISC-VC delivered by the IM and ID routes without the use of adjuvant, because (i) avoiding adjuvant is seen as one of interesting aspects of the DC-targeting approach and (ii) adjuvant can mask the DC-targeting effect (35). Furthermore CpG showed only minor effect on immune response in experiment 1. We also excluded uncomplexed SA-AG which did not show any immunogenicity difference with VC in experiment 1. As we did not observe Ab responses to M2e in experiment 1, where the HA2-SA-M2e chimera were used, we chose to generate VC where SA-HA2 and SA-M2e were separated, in case that the M2e-antigenic motives had been buried in the HA2-SA-M2e chimera. In this experiment, we also included a group of unvaccinated pigs (control) and we analyzed the Ab response to VC by comparison with this group. The vaccinated pigs presented higher levels of anti-NP IgG at 75 dpv compared to control pigs (Figure 4A). Only pigs injected with VC *via* the IM route presented significant levels of anti-HA2 IgG compared to control pigs (Figure 4B); in addition, three pigs in the CD11c-VC and ISC-VC groups injected by the IM route developed anti-M2e titers above 100 (Figure 4C), which had not been obtained by the ID administration of either experiment 1 and 2. The IFN γ response of fresh PBMC collected at 70 dpv to NP was not statistically different between the CD11c-VC and the ISC-VC group vaccinated by the ID route (Figure 4D) but it was significantly higher in the CD11c-VC versus ISC-VC group vaccinated by the IM route ($p = 0.01$, Figure 4D). Due to time and effort constraints, we have not measured the T cell response in the control pigs. There again no correlation was found between preexisting levels of anti-HA2 and NP IgG and the measured immune responses (data not shown). Thus the IM

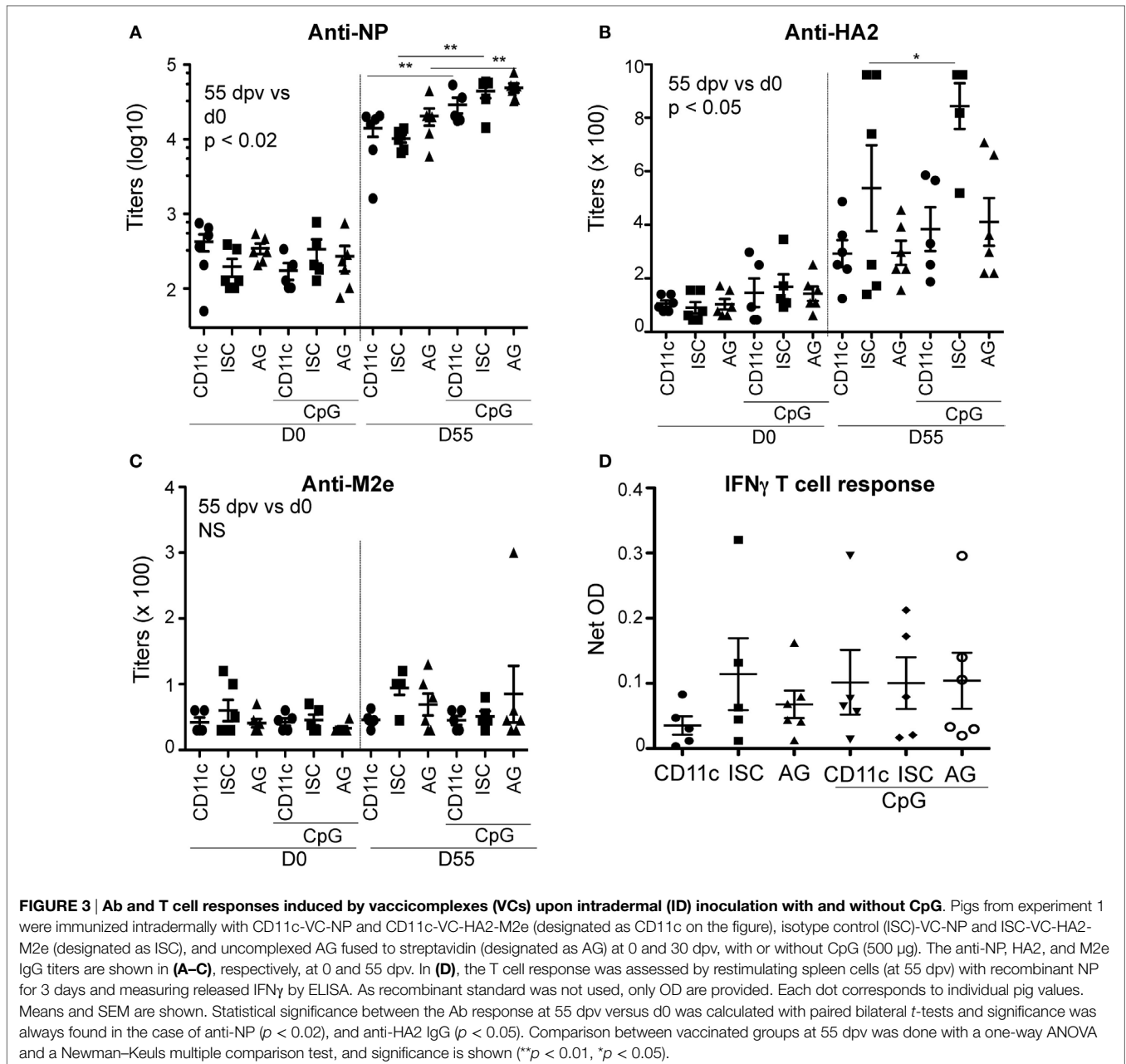


FIGURE 3 | Ab and T cell responses induced by vaccicomplexes (VCs) upon intradermal (ID) inoculation with and without CpG. Pigs from experiment 1 were immunized intradermally with CD11c-VC-NP and CD11c-VC-HA2-M2e (designated as CD11c on the figure), isotype control (ISC)-VC-NP and ISC-VC-HA2-M2e (designated as ISC), and uncomplexed AG fused to streptavidin (designated as AG) at 0 and 30 dpv, with or without CpG (500 μ g). The anti-NP, HA2, and M2e IgG titers are shown in (A–C), respectively, at 0 and 55 dpv. In (D), the T cell response was assessed by restimulating spleen cells (at 55 dpv) with recombinant NP for 3 days and measuring released IFN γ by ELISA. As recombinant standard was not used, only OD are provided. Each dot corresponds to individual pig values. Means and SEM are shown. Statistical significance between the Ab response at 55 dpv versus d0 was calculated with paired bilateral *t*-tests and significance was always found in the case of anti-NP ($p < 0.02$), and anti-HA2 IgG ($p < 0.05$). Comparison between vaccinated groups at 55 dpv was done with a one-way ANOVA and a Newman–Keuls multiple comparison test, and significance is shown (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

route triggered a broader response to the conserved IAV AG than the ID route, and presented an advantage to the CD11c-targeted VC for promoting T cell response which was not observed in the ID route.

Induction of Partial Viral Protection with VC Inoculated IM and Induction of Disease Exacerbation with VC Inoculated ID

Pigs from experiment 2 were challenged with pandemic (H1N1) 2009 by the intratracheal route at 75 dpv. All pigs showed a temperature peak at 1 dpc without differences between groups (data not shown). Symptoms were mild in the control group and

were expressed as nasal or oral discharges and conjunctivitis (Figure 5), in agreement with other studies (36). Whereas vaccinated pigs by the IM route showed a tendency to express less symptoms with a shorter duration than the controls, the groups vaccinated intradermally with CD11c-VC, presented disease exacerbation (Figure 5; Figure S3 in Supplementary Material). Virus was detected in nasal swabs in all pigs between 3 and 5 dpc and was not detected at day 8 (Figure 5). Interestingly, most pigs vaccinated by the IM route did not shed virus at 6 dpc whereas the pigs in the control and in the ID vaccinated group still did (Figure 5). These results indicate that the immune response triggered by VC injected *via* the IM route affects viral shedding duration, whereas the immune response triggered by CD11c-VC

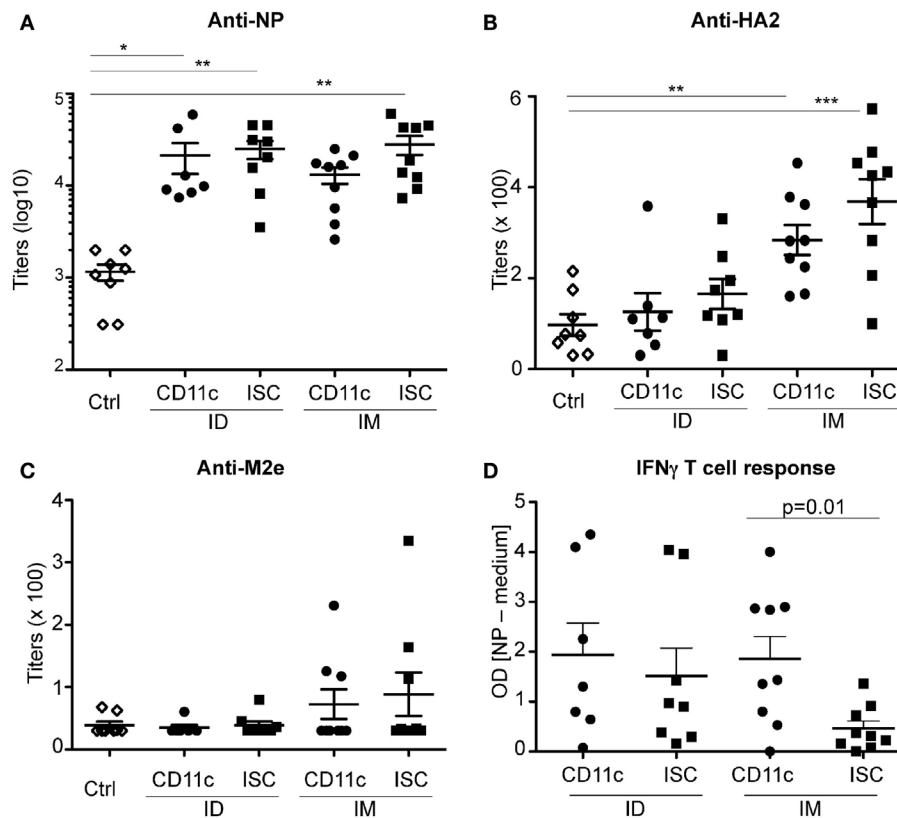


FIGURE 4 | Ab and T cell responses induced by vaccicomplexes (VCs) upon intradermal (ID) and intramuscular (IM) inoculation without adjuvant.

Pigs from experiment 2 were immunized either by ID or IM routes, with CD11c-VC-NP + CD11c-VC-HA2 + CD11c-VC-M2e (designated as CD11c), or isotype control (ISC)-VC-NP + ISC-VC-HA2 + ISC-VC-M2e (designated as ISC) at 0 and 50 dpv. The anti-NP, HA2, and M2e IgG titers are shown in (A–C), respectively, at 0 and 75 dpv. In (D), the T cell response was assessed by restimulating fresh PBMCs collected at 70 dpv with recombinant NP for 3 days and measuring released IFN γ by ELISA. As recombinant standard was not used, only DO are provided. Each dot corresponds to individual pig values. Means and SEM are shown. Comparison between vaccinated groups and the control non-vaccinated group was done with a one-way ANOVA and a Dunnett's comparison test, and significance is shown (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

injected *via* the ID route is detrimental on clinical symptoms upon challenge.

Reduction of Viral Shedding Correlates with Anti-HA2 and Anti-M2e IgG Responses and not with anti-NP Responses Induced by VC

We used PCA to identify the result variables that were responsible for the variation of the data across vaccinated pigs. The variables included viral shedding at 3–6 dpc, global clinical scores, IgG titers at 75 dpv and 5 dpc, and T cell response at 70 dpv. As depicted in **Figure 6A**, the route of inoculation (PC1) contributes to 28.9% of the variation between pigs. **Figure 6B** shows the PCA loading for each variable and indicates that viral shedding at 6 dpc opposes to anti-HA2 and anti-M2e IgG levels at the day of challenge and 5 dpc with anti-HA2 at the day of challenge having the highest weight. A two-tailed Spearman test between the viral shedding at 6 dpc and anti-HA2, anti-M2e, and anti-NP at 75 dpv and 5 dpc confirmed that viral shedding at 6 dpc was anti-correlated mainly with anti-HA2 ($r = -0.7$, $p < 0.001$ at 75 dpv and $r = -0.5$ at

5 dpc, $p < 0.01$) and less so with anti-M2e ($r = -0.37$ at 75 dpv and -0.33 at 5 dpc, $p < 0.05$) and did not anti-correlate with anti-NP IgG response (Figure S4 in Supplementary Material). Overall our data analysis confirms that the route of VC inoculation has a dominant impact on the outcome of the immune response, and indicates that HA2 stalk stands as the most promising conserved IAV AG for the design of universal vaccine.

DISCUSSION

Our results reveal that vaccination with conserved IAV AGs can induce disease exacerbation in the pig model, supporting the initial observation obtained with NP and M2e-based DNA vaccines (13). Whereas we aimed at preventing this detrimental effect with DC targeting, on the contrary we found that CD11c-targeting promoted disease exacerbation when injected ID. Conversely partial viral protection was obtained when the IAV AGs were delivered by the IM and not the ID route, independently of DC targeting. Despite that higher T cell response was obtained with CD11c targeting in the IM route, it did not translate in better

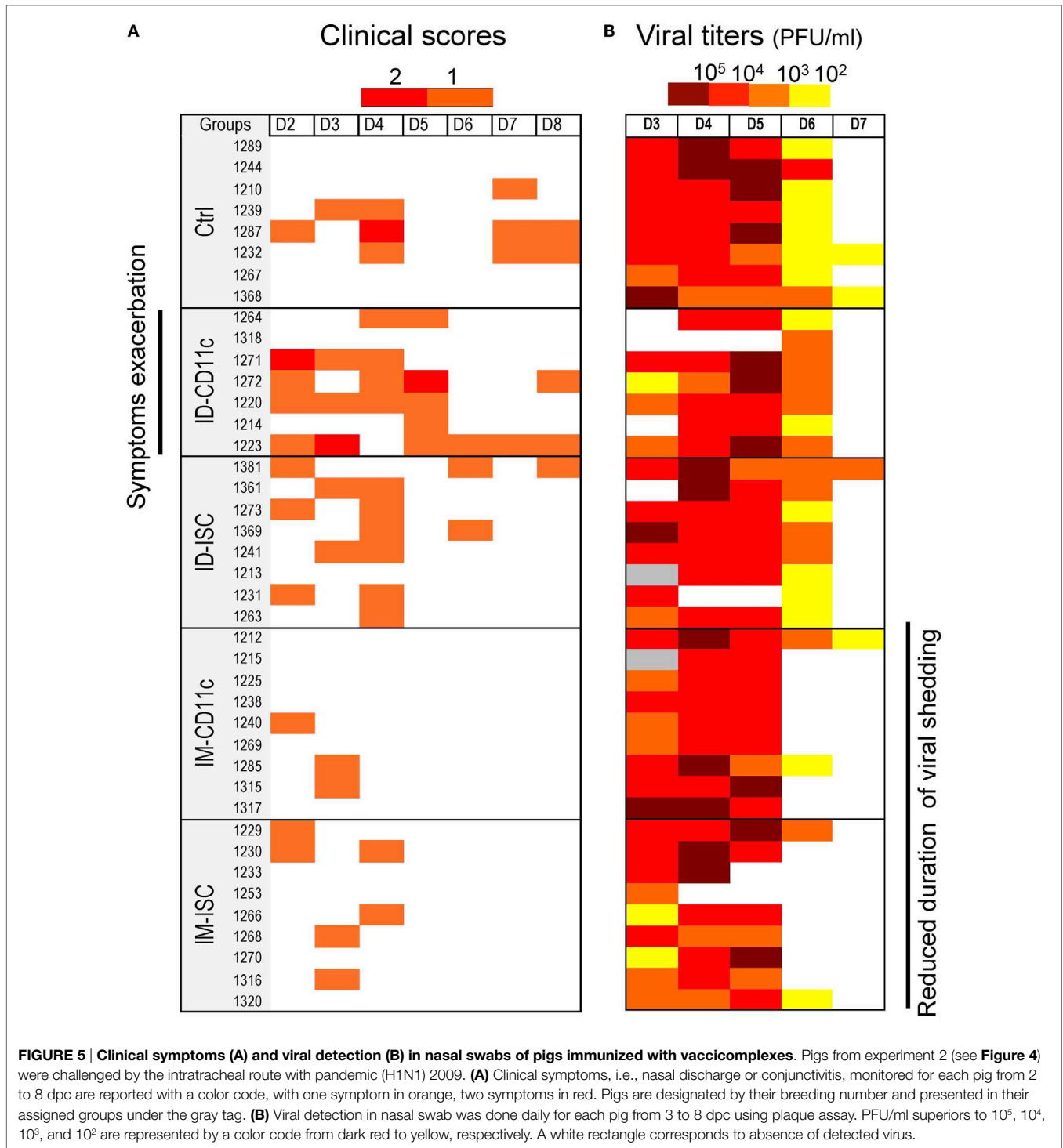
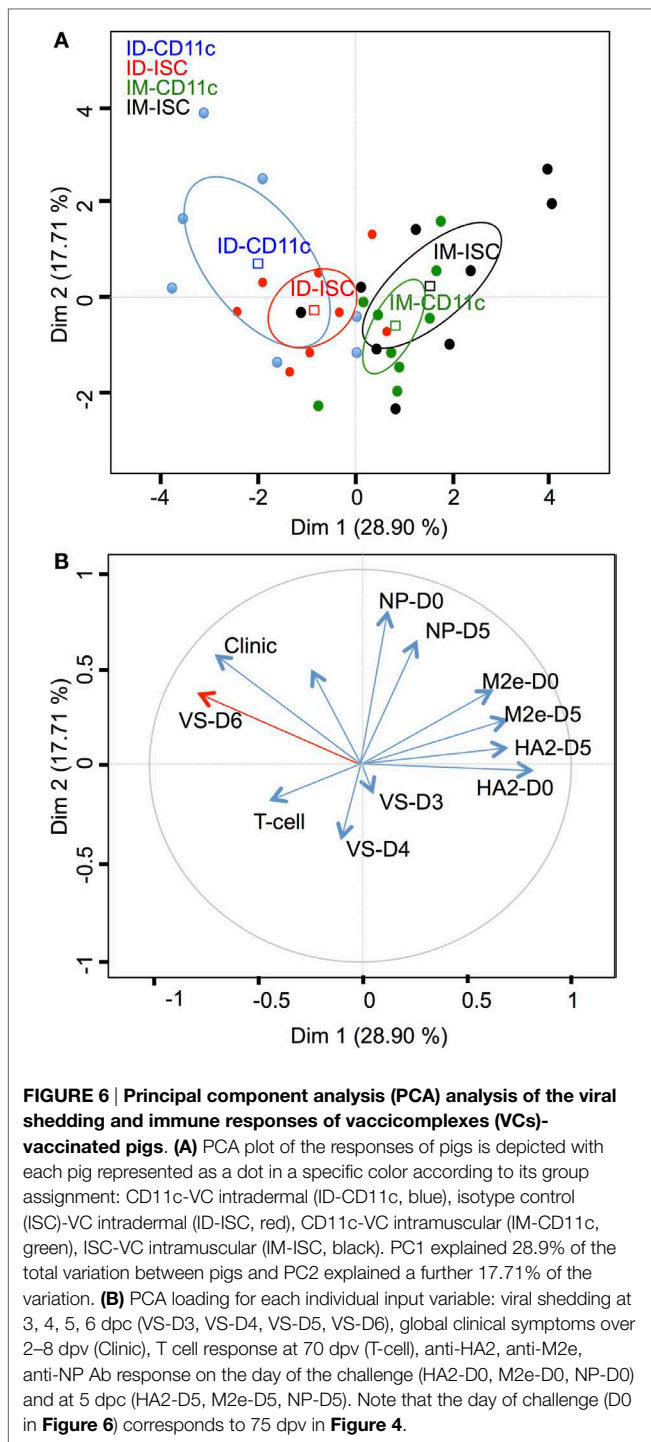


FIGURE 5 | Clinical symptoms (A) and viral detection (B) in nasal swabs of pigs immunized with vaccicomplexes. Pigs from experiment 2 (see Figure 4) were challenged by the intratracheal route with pandemic (H1N1) 2009. (A) Clinical symptoms, i.e., nasal discharge or conjunctivitis, monitored for each pig from 2 to 8 dpc are reported with a color code, with one symptom in orange, two symptoms in red. Pigs are designated by their breeding number and presented in their assigned groups under the gray tag. (B) Viral detection in nasal swab was done daily for each pig from 3 to 8 dpc using plaque assay. PFU/ml superiors to 10⁵, 10⁴, 10³, and 10² are represented by a color code from dark red to yellow, respectively. A white rectangle corresponds to absence of detected virus.

protection. Finally, viral clearance correlated with anti-HA2 and M2e IgG levels and not with anti-NP IgG levels.

The IM route revealed to be more suitable than the ID route to induce the desired immunity in our setting and to observe a benefit of CD11c targeting on the T cell response. To our knowledge, previous reports on DC targeting of protein vaccines utilized mainly the intravenous route, less often the subcutaneous, the

intranasal and the IM routes, and rarely the ID route (19). We speculated that the high bolus of AG in the small and confined ID compartment would favor the capture by the local DC, thus not offering advantage to CD11c targeting. Furthermore, the ID route is reactogenic and triggers rapid local inflammation, which could result in rapid AG degradation by the recruited myeloid cells (neutrophils, monocytes) that could explain the lack of



response to VC-HA2 and VC-M2e injected ID in experiment 2. Furthermore, the reactogenicity of the ID site may provide a priming milieu for subsequent detrimental response upon IAV exposure. Indeed, CRX-601 TLR4-L combined with split-influenza AG administered by the intranasal routes and not by the subcutaneous route, induced disease exacerbation after challenge with IAV (14). Expansion of vaccine-primed Th17 cells was responsible of the increased morbidity. We indeed observed

a local inflammation after VC and uncomplexed SA-AG upon ID administration, which disappeared after 4–5 days. The endotoxin levels per injection were below 150 EU, which is below the accepted endotoxin limit in humans (37); nevertheless, endotoxins may have contributed to the local response and possibly to the deleterious priming.

We chose to target DC with an in-house developed mAb to swine CD11c as previous successful CD11c targeting was achieved *in vivo* in mice (23, 24, 38, 39) and *in vitro* in humans (40). In addition, the pattern of CD11c expression on pig skin and blood myeloid cell subsets whose organization aligns across species (41–43), is closer to the human than to the mouse one, making pig a pertinent preclinical model to evaluate this type of targeting. Indeed, CD11c shows a higher expression on cDC2 than on cDC1 and is highly expressed on skin monocyte-derived cells in the pig and human (25, 44) and not in the mouse (45). Consequently, when injected in pigs, VC were not uniquely targeted to cDC, which are the most potent AG-presenting cells and could have even been targeted to counterproductive cells, for instance monocyte-derived cells or even granulocytes. The variation in targeting selectivity across species might explain outcome differences of DC-targeting strategies between mice and large mammals (19). Thus more selective immunoreceptors could reveal to be better targets, such as XCR1 which is specifically expressed on cDC1 in all mammalian species investigated so far and for which we recently validated a suitable targeting tool (25). Mouse and human studies demonstrated that CLEC9A, which is expressed on cDC1 and plasmacytoid DC (pDC) (46), and CLEC10A, which is expressed on cDC2 and monocyte-derived DC (17), are promising molecular targets for DC targeting. However, pig do not seem to possess a functional CLEC9A gene and, despite the existence of a putative swine CLEC10A coding sequence, we were unable to identify a corresponding mRNA nor to show any specific interaction of pig skin DC with Tn-glycopeptide, the ligand of CLEC10A in other mammals (unpublished data). Indeed, the selection of the immunoreceptor is key for the success of immunotargeting, but despite intensive research, the requested criteria for improved responses have not yet been identified (47). It is assumed that both the DC subtype and/or the endosomal compartment of AG routing consecutive to targeting are important parameters as receptor expression level, proportion of surface turnover, and speed of receptor internalization do not impact on AG presentation efficiency (47).

The VC strategy with SA-AG and biot-mAb has the great advantage of being simple and versatile (21). However, this approach presents potential caveats. First, the biotinylation and the large tetramerised AGs may interfere with the interaction between the Ab and its targeted immunoreceptor. The used mouse IgG1 could be intrinsically immunogenic or lead to immune competition with the vaccine AG as well as interact with the pig Fc receptors. We measured anti-mouse IgG-pig IgG by ELISA in the pig serum of the experiment 1 and found low titers (200 ± 186 in all vaccinated pigs, without difference across groups). Finally, it should also be stressed that the influenza AG delivered by our VCs are most likely not in their native conformation. The native M2 is tetrameric while native HA2 is trimeric in the viral particles (48, 49). However, several reports, including

work from our research groups, have shown that non-tetrameric M2e and non-trimeric HA2 AGs can also elicit antibodies that are protective against a viral challenge (8, 27, 28, 50). Importantly, the mechanism of protection induced by such non-native M2e and HA2 structures was shown to involve ADCC (9, 51) and not the classical neutralization by antibodies. The conformation required to elicit antibodies against HA2 and M2e that are efficient in ADCC has not been determined to our knowledge. Nevertheless, it remains very possible that the non-native conformation of the influenza AG in the VCs accounts for the limited protective immunity achieved here.

Many preclinical and clinical studies concluded on the requirement to activate DC together with immunotargeting in order to achieve optimal response. CD40L and TLR ligands have been largely used for that purpose, including CpG in mouse models (16). However in the mouse, both pDC and cDC respond to TLR9 stimulation whereas in human, only pDC express TLR9 (52). A very recent study in pigs show that although cDC and monocyte-derived DC express TLR9 mRNA, they do not upregulate cytokine nor costimulatory molecule expression upon exposure to CpG, unless cocultured with pDC (53, 54). As the skin does not contain pDC at steady state (55), it may explain the low adjuvant effect of CpG given by the ID route. We decided to perform experiment 2 without adjuvant, because (i) avoiding adjuvants would be a major advantage in clinical applications of DC targeting, (ii) there are several examples of improved immune responses to DC-targeted AGs delivered in the absence of adjuvants (18, 56) and specifically in the case of CD11c (22, 57), and (iii) adjuvant did mask the effect of DC targeting in macaques (35). However, adjuvants could be beneficial to promote the B and T cell responses induced by VC in the IM route. Furthermore the reduction of viral shedding—certainly limited in this study—correlated with the anti-HA2 and M2e IgG levels induced by VC, encouraging the use of these AGs for universal IAV vaccine development in the pig as a pertinent animal model. We think that the anti-HA2 and anti-M2e Ab levels could be much further increased and achieve better viral protection, if VC would be combined with suitable adjuvants. Strong efforts should be pursued to identify non-mineral/non-organic adjuvants and their formulation for the pigs.

Preclinical development of universal IAV vaccines have been largely assessed using influenza-naïve small animal models. However, vaccination strategies are influenced by preexisting influenza-specific immunity (58, 59). In the present study with conventional pigs, the animals presented preexisting levels of anti-NP and HA2 Ab, as it is very often the case in natural field condition. These Ab can either result from passive immunity

with maternal transfer or active immunity in case of exposure to the virus, which is not easy to analyze *a posteriori*. In any event, we did not observe a negative correlation between the levels of preexisting Ab and the vaccine-induced Ab or T cell responses, indicating that immunization with conserved IAV AG in VC did not appear to be affected by preexisting Ab.

Our findings have important implication in the vaccinology field. Indeed, we showed that the ID route, despite being rich in DC, was not suitable to induce the desired immunity with our DC-targeted strategy. Worst, the ID route led to disease exacerbation. Conversely in contrast with the ID route, the IM route permitted to (i) unravel the benefit of DC targeting on the T cell response, (ii) generate a broader IgG response against the three conserved AG, and (iii) confer partial protection. Thus, our results also emphasize that the route of inoculation is of major importance to assess molecular DC targeting and that the IM route should be especially considered. And on the applied side, the IM route also offers the advantage to be classically used, easy to perform, and less painful than the ID route.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB-C, CD, OS, EB, CU, C-AR, MM, BC, CC, NB, and IS-C performed laboratory experiments (immunoassays, virology, VC construction, and production). LJ performed the PCA analysis. CB, OB, and JP performed animal experiments. CL, PS, CC, NB, and IS-C designed experiments, directed research, and revised the manuscript. IS-C prepared figures and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière for providing pig skin and alveolar macrophage. The authors are very grateful to Thierry Chaumeil, Maud Renouard, Olivier Dubès, Anne Pinard, Guillaume Martin, and Dany Léguéré for their precious help in the pig experiment. This work was supported by the Agence National de la Recherche grant DCskin-VacFlu, ANR 2011-ISV3-001-01 (CD, EB, NB, IS-C), and by the grants M200201213 of the CAS (PS), TA03010331 of TACR (PS), and QJ1210041 of MZe (OS) of the Czech Republic.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

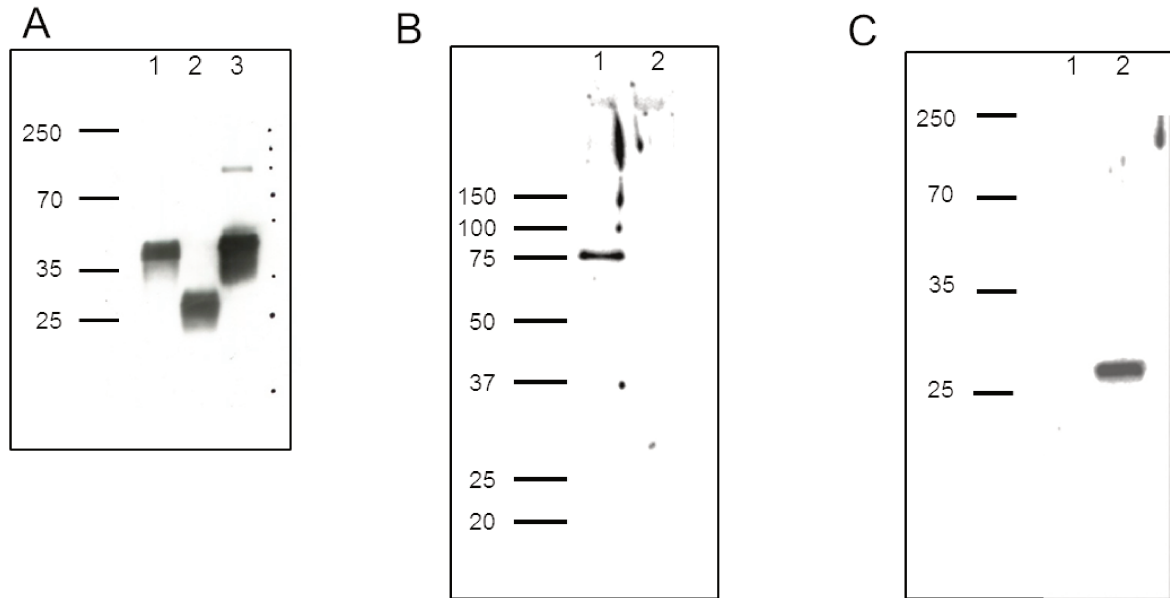
The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00641/full#supplementary-material>.

REFERENCES

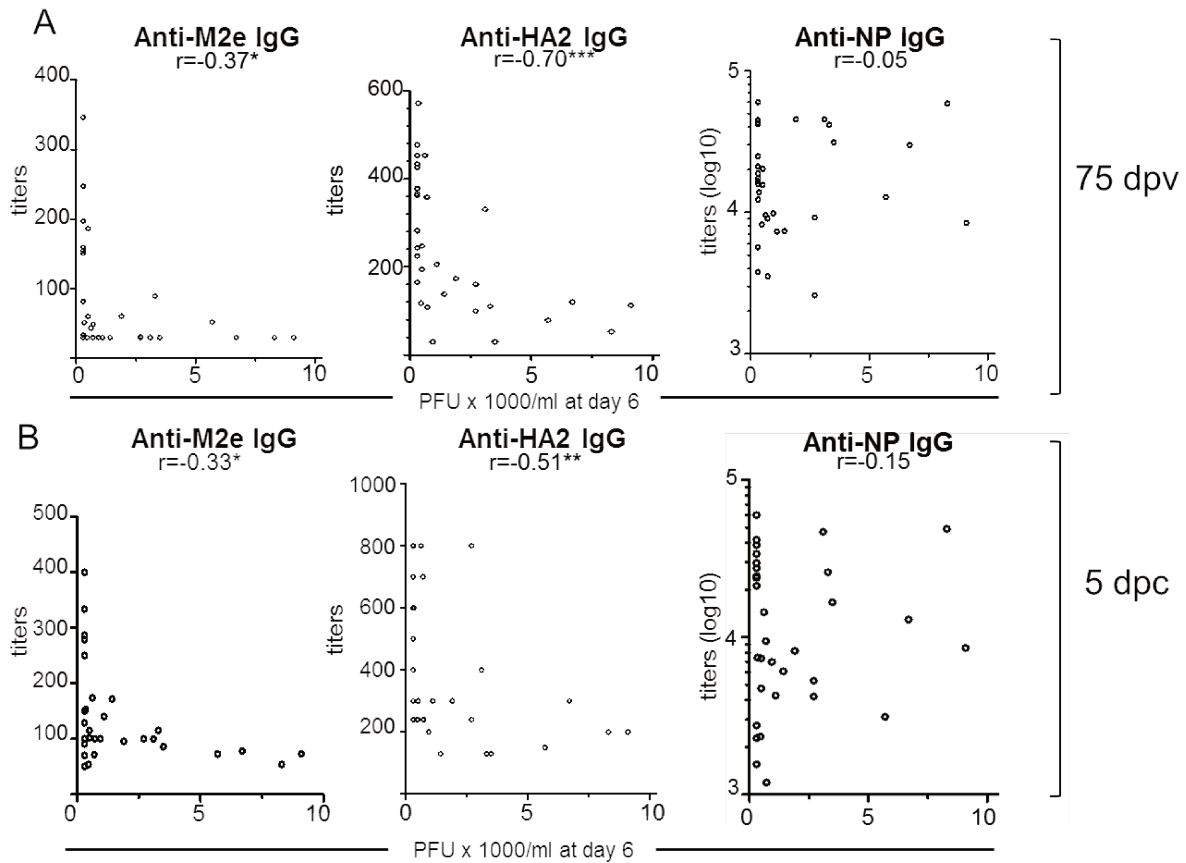
1. Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis* (2006) 12(1):48–54. doi:10.3201/eid1201.051237
2. Macleod MK, David A, Jin N, Noges L, Wang J, Kappler JW, et al. Influenza nucleoprotein delivered with aluminium salts protects mice from an influenza A virus that expresses an altered nucleoprotein sequence. *PLoS One* (2013) 8(4):e61775. doi:10.1371/journal.pone.0061775
3. Epstein SL, Kong WP, Misplon JA, Lo CY, Tumpey TM, Xu L, et al. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* (2005) 23(46–47):5404–10. doi:10.1016/j.vaccine.2005.04.047
4. Li Z, Gabbard JD, Mooney A, Gao X, Chen Z, Place RJ, et al. Single-dose vaccination of a recombinant parainfluenza virus 5 expressing NP from H5N1 virus provides broad immunity against influenza A viruses. *J Virol* (2013) 87(10):5985–93. doi:10.1128/JVI.00120-13
5. Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang WS, Chen YH. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* (2007) 25(52):8868–73. doi:10.1016/j.vaccine.2007.09.056
6. Fan J, Liang X, Horton MS, Perry HC, Citron MP, Heidecker GJ, et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in

- mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* (2004) 22(23–24):2993–3003. doi:10.1016/j.vaccine.2004.02.021
7. Nachbagauer R, Miller MS, Hai R, Ryder AB, Rose JK, Palese P, et al. Hemagglutinin stalk immunity reduces influenza virus replication and transmission in ferrets. *J Virol* (2015) 90(6):3268–73. doi:10.1128/JVI.02481-15
 8. Stanekova Z, Adkins I, Kosova M, Janulikova J, Sebo P, Vareckova E. Heterosubtypic protection against influenza A induced by adenylate cyclase toxoids delivering conserved HA2 subunit of hemagglutinin. *Antiviral Res* (2012) 97(1):24–35. doi:10.1016/j.antiviral.2012.09.008
 9. DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, Ravetch JV. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo. *Nat Med* (2014) 20(2):143–51. doi:10.1038/nm.3443
 10. Breathnach CC, Clark HJ, Clark RC, Olsen CW, Townsend HG, Lunn DP. Immunization with recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge. *Vaccine* (2006) 24(8):1180–90. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.091
 11. Ma W, Kahn RE, Richt JA. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. *J Mol Genet Med* (2008) 3(1):158–66.
 12. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* (2009) 459(7250):1122–5. doi:10.1038/nature08182
 13. Heinen PP, Rijsewijk FA, de Boer-Luijze EA, Bianchi AT. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J Gen Virol* (2002) 83(Pt 8):1851–9. doi:10.1099/0022-1317-83-8-1851
 14. Maroof A, Yorgensen YM, Li Y, Evans JT. Intranasal vaccination promotes detrimental Th17-mediated immunity against influenza infection. *PLoS Pathog* (2014) 10(1):e1003875. doi:10.1371/journal.ppat.1003875
 15. Melero JA. Influence of antigen conformation and mode of presentation on the antibody and protective responses against human respiratory syncytial virus: relevance for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* (2016) 15:1319–25. doi:10.1080/14760584.2016.1175941
 16. Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* (2014) 27:26–32. doi:10.1016/j.coi.2014.01.005
 17. Lehmann CH, Heger L, Heidkamp GF, Baranska A, Luhr JJ, Hoffmann A, et al. Direct delivery of antigens to dendritic cells via antibodies specific for endocytic receptors as a promising strategy for future therapies. *Vaccines (Basel)* (2016) 4(2):E8. doi:10.3390/vaccines4020008
 18. Kastenmuller W, Kastenmuller K, Kurts C, Seder RA. Dendritic cell-targeted vaccines – hope or hype? *Nat Rev Immunol* (2014) 14(10):705–11. doi:10.1038/nri3727
 19. Alvarez B, Poderoso T, Alonso F, Ezquerra A, Dominguez J, Revilla C. Antigen targeting to APC: from mice to veterinary species. *Dev Comp Immunol* (2013) 41(2):153–63. doi:10.1016/j.dci.2013.04.021
 20. Stanek O, Linhartova I, Majlessi L, Leclerc C, Sebo P. Complexes of streptavidin-fused antigens with biotinylated antibodies targeting receptors on dendritic cell surface: a novel tool for induction of specific T-cell immune responses. *Mol Biotechnol* (2012) 51(3):221–32. doi:10.1007/s12033-011-9459-6
 21. Dong H, Stanek O, Salvador FR, Langer U, Morillon E, Ung C, et al. Induction of protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by delivery of ESX antigens into airway dendritic cells. *Mucosal Immunol* (2013) 6(3):522–34. doi:10.1038/mi.2012.92
 22. Wang H, Griffiths MN, Burton DR, Ghazal P. Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(2):847–52. doi:10.1073/pnas.97.2.847
 23. Ejaz A, Ammann CG, Werner R, Huber G, Oberhauser V, Horl S, et al. Targeting viral antigens to CD11c on dendritic cells induces retrovirus-specific T cell responses. *PLoS One* (2012) 7(9):e45102. doi:10.1371/journal.pone.0045102
 24. Castro FV, Tutt AL, White AL, Teeling JL, James S, French RR, et al. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur J Immunol* (2008) 38(8):2263–73. doi:10.1002/eji.200838302
 25. Deloizy C, Bouguyon E, Fossum E, Sebo P, Osicka R, Bole A, et al. Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: reagents to porcine CD11c and XCR1. *Dev Comp Immunol* (2016) 65:31–40. doi:10.1016/j.dci.2016.06.015
 26. Linghua Z, Xingshan T, Fengzhen Z. In vivo effects of oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in the immune response to swine streptococcal septicemia vaccine in weaned piglets. *Mol Immunol* (2007) 44(6):1141–9. doi:10.1016/j.molimm.2006.07.001
 27. De Filette M, Min Jou W, Birkett A, Lyons K, Schultz B, Tonkyro A, et al. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology* (2005) 337(1):149–61. doi:10.1016/j.viro.2005.04.004
 28. Herve PL, Raliou M, Bourdieu C, Dubuquoy C, Petit-Camurda A, Bertho N, et al. A novel subnucleocapsid nanoplateform for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *J Virol* (2014) 88(1):325–38. doi:10.1128/JVI.01141-13
 29. Tarus B, Chevalier C, Richard CA, Delmas B, Di Primo C, Slama-Schwok A. Molecular dynamics studies of the nucleoprotein of influenza A virus: role of the protein flexibility in RNA binding. *PLoS One* (2012) 7(1):e30038. doi:10.1371/journal.pone.0030038
 30. Leymarie O, Embury-Hyatt C, Chevalier C, Jouneau L, Moroldo M, Da Costa B, et al. PB1-F2 attenuates virulence of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus in chickens. *PLoS One* (2014) 9(6):e100679. doi:10.1371/journal.pone.0100679
 31. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(11):6108–13. doi:10.1073/pnas.100133697
 32. Szretter KJ, Balish AL, Katz JM. UNIT 15G.1 Influenza: propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol* (2006) 3:G:15G.1.1–15G.1.22. doi:10.1002/0471729256.mc15g01s3
 33. Maisonnasse P, Bouguyon E, Piton G, Ezquerra A, Urien C, Deloizy C, et al. The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunol* (2016) 9:835–49. doi:10.1038/mi.2015.105
 34. Mastin A, Alarcon P, Pfeiffer D, Wood J, Williamson S, Brown I, et al. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. *PLoS Curr* (2011) 3:RRN1209. doi:10.1371/currents.RRN1209
 35. Li J, Ahmet F, Sullivan LC, Brooks AG, Kent SJ, De Rose R, et al. Antibodies targeting Clec9A promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates. *Eur J Immunol* (2015) 45(3):854–64. doi:10.1002/eji.201445127
 36. Henningson JN, Rajao DS, Kitikoon P, Lorusso A, Culhane MR, Lewis NS, et al. Comparative virulence of wild-type H1N1pdm09 influenza A isolates in swine. *Vet Microbiol* (2015) 176(1–2):40–9. doi:10.1016/j.vetmic.2014.12.021
 37. Williams KL. *Endotoxins*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker (2001).
 38. Wei H, Wang S, Zhang D, Hou S, Qian W, Li B, et al. Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. *Clin Cancer Res* (2009) 15(14):4612–21. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3321
 39. Kurts C. CD11c: not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target. *Eur J Immunol* (2008) 38(8):2072–5. doi:10.1002/eji.200838645
 40. Cohn L, Chatterjee B, Esselborn F, Smed-Sorensen A, Nakamura N, Chalouni C, et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J Exp Med* (2013) 210(5):1049–63. doi:10.1084/jem.20121251
 41. Marquet F, Bonneau M, Pascale F, Urien C, Kang C, Schwartz-Cornil I, et al. Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the Swine model. *PLoS One* (2011) 6(1):e16320. doi:10.1371/journal.pone.0016320
 42. Marquet F, Vu Manh TP, Maisonnasse P, Elhmouzi-Younes J, Urien C, Bouguyon E, et al. Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J Immunol* (2014) 193(12):5883–93. doi:10.4049/jimmunol.1303150
 43. Vu Manh TP, Elhmouzi-Younes J, Urien C, Ruscanu S, Jouneau L, Bourge M, et al. Defining mononuclear phagocyte subset homology across several distant warm-blooded vertebrates through comparative transcriptomics. *Front Immunol* (2015) 6:299. doi:10.3389/fimmu.2015.00299
 44. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141(hi) cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103(+) nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* (2012) 37(1):60–73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012
 45. Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of

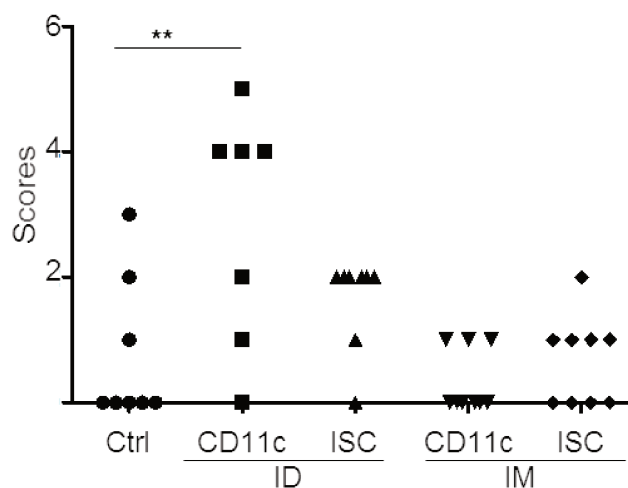
- conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* (2013) 39(5):925–38. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.004
46. Tullett KM, Lahoud MH, Radford KJ. Harnessing human cross-presenting CLEC9A(+)XCR1(+) dendritic cells for immunotherapy. *Front Immunol* (2014) 5:239. doi:10.3389/fimmu.2014.00239
 47. Reuter A, Panozza SE, Macri C, Dumont C, Li J, Liu H, et al. Criteria for dendritic cell receptor selection for efficient antibody-targeted vaccination. *J Immunol* (2015) 194(6):2696–705. doi:10.4049/jimmunol.1402535
 48. De Filette M, Martens W, Roose K, Deroo T, Vervalle F, Bentahir M, et al. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem* (2008) 283(17):11382–7. doi:10.1074/jbc.M800650200
 49. Schneemann A, Speir JA, Tan GS, Khayat R, Ekiert DC, Matsuoka Y, et al. A virus-like particle that elicits cross-reactive antibodies to the conserved stem of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* (2012) 86(21):11686–97. doi:10.1128/JVI.01694-12
 50. Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* (1999) 5(10):1157–63. doi:10.1038/13484
 51. El Bakkouri K, Descamps F, De Filette M, Smet A, Festjens E, Birkett A, et al. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J Immunol* (2011) 186(2):1022–31. doi:10.4049/jimmunol.0902147
 52. Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* (2003) 33(4):827–33. doi:10.1002/eji.200323797
 53. Guzylack-Piriou L, Piersma S, McCullough K, Summerfield A. Role of natural interferon-producing cells and T lymphocytes in porcine monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunology* (2006) 118(1):78–87. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02343.x
 54. Auray G, Keller I, Python S, Gerber M, Bruggmann R, Ruggli N, et al. Characterization and transcriptomic analysis of porcine blood conventional and plasmacytoid dendritic cells reveals striking species-specific differences. *J Immunol* (2016) 197(12):4791–806. doi:10.4049/jimmunol.1600672
 55. Clausen BE, Stoitzner P. Functional specialization of skin dendritic cell subsets in regulating T cell responses. *Front Immunol* (2015) 6:534. doi:10.3389/fimmu.2015.00534
 56. Caminschi I, Lahoud MH, Shortman K. Enhancing immune responses by targeting antigen to DC. *Eur J Immunol* (2009) 39(4):931–8. doi:10.1002/eji.200839035
 57. Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol* (1996) 157(4):1406–14.
 58. Andrews SF, Kaur K, Pauli NT, Huang M, Huang Y, Wilson PC. High preexisting serological antibody levels correlate with diversification of the influenza vaccine response. *J Virol* (2015) 89(6):3308–17. doi:10.1128/JVI.02871-14
 59. Loeffen WL, Heinen PP, Bianchi AT, Hunneman WA, Verheijden JH. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet Immunol Immunopathol* (2003) 92(1–2):23–35. doi:10.1016/S0165-2427(03)00019-9
- Conflict of Interest Statement:** CL, PS and OS are inventors of the issued patent “A versatile delivery system for antigens or biologically active molecules”. EP 09290987.8-1222, 21.12.09. No licence nor royalties. The other authors declare no conflict of interest.
- Copyright © 2016 Bernelin-Cottet, Deloizy, Stanek, Barc, Bouguyon, Urien, Boulesteix, Pezant, Richard, Moudjou, Da Costa, Jouneau, Chevalier, Leclerc, Sebo, Bertho and Schwartz-Cornil. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



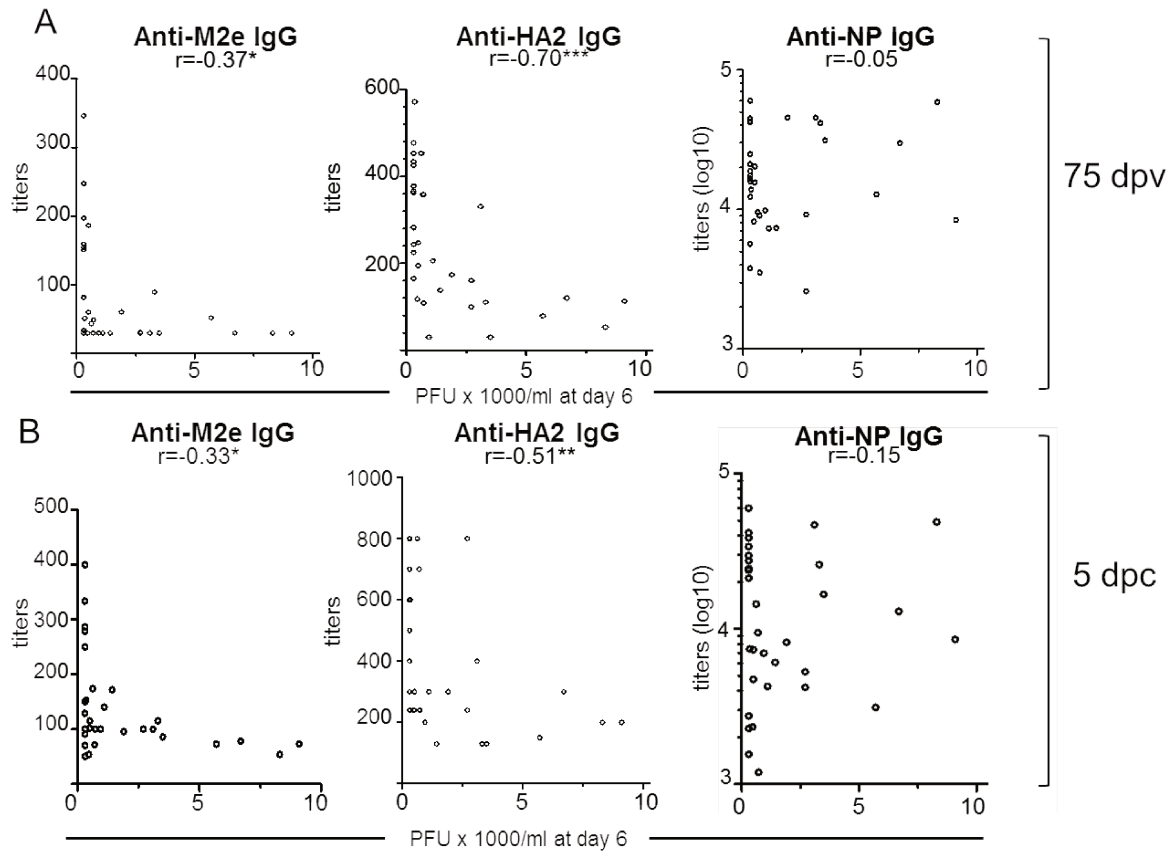
Supplementary Figure 1: Western blot analysis of SA-AG. **A.** HA2-SA-M2e (lane 1), SA-M2e (lane 2) and M2e-nucleoprotein carrier (lane 3) (400 ng each) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions. M2e was detected with anti-M2e mAb (0.3 $\mu\text{g/ml}$) followed by HRP-conjugated anti-mouse IgG. **B.** SA-NP (lane 1) and SA-HA2 (lane 2) (20ng each) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions, NP was detected with 1/3000 dilution anti-NP rabbit IgG, followed by HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/10000). **C.** SA-NP (lane 1) and SA-HA2 (lane 2) (450ng each) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and HA2 was detected with anti-HA2 (5 $\mu\text{g/ml}$) followed by HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/10000). In A, B, C, control blots with irrelevant primary antibodies were performed to control for specificity. Detection was done with enhanced chemiluminescence.



Supplementary Figure 2: lack of correlation between pre-existing anti-NP and HA2 Ab levels and Ab and T cell response to VC. As there was no differences between the results in VC and SA-AG groups, they were amalgamed. The groups receiving CpG were grouped separately to avoid CpG confounding effect. The anti-NP (A) and anti-HA2 (B) titers at d0 were plotted against the homologous titers at 55 dpv. The anti-NP titers at d0 were also plotted against the NP-specific T cell response. No correlation could be found (two tailed Spearman test).



Supplementary Figure 3: intradermal route administration of CD11c-VC exacerbates disease. Pigs were immunised either by intradermal or intramuscular routes, with CD11c-VC-NP + CD11c-VC-HA2 + CD11c-VC-M2e (CD11c), or ISC-VC-NP + ISC-VC-HA2 + ISC-VC-M2e (ISC) at day 0 and 50 dpv. They were challenged at 75 dpv by the intratracheal route with pandemic (H1N1) 2009 virus. The global clinical scores were established based on the number of observed symptoms over the 2 to 8 dpc period. The difference between groups was analysed for statistical difference with an ANOVA followed by a Dunnett's test (** $p < 0.01$).



Supplementary Figure 4. Viral shedding at 6 dpc is negatively correlated with anti-HA2 response. Anti-M2e, anti-HA2, and anti-NP IgG titers at the day of challenge (75 dpv, A) or 5 dpc (B) were plotted against viral shedding in nasal swab at 6 dpc. Correlation (r) was calculated using two-tailed Spearman test (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Article n°2 : « Évaluation des propriétés immunogéniques de vaccins à ADN administrés avec ou sans des nanoparticules, par électroporation ou avec des patches à micro-aiguilles dans la peau de porc»

Journal ciblé : Journal of Controlled Release | impact factor in 2017 : 7,877

Les vaccins à ADN sont une alternative prometteuse présentant de nombreux avantages. Ils sont sûrs, adaptables aux souches émergentes, faciles à produire et particulièrement inducteurs de réponses lymphocytaires T. La plupart des études ont été menées dans le modèle murin mais ils nécessitent d'être améliorés pour envisager une application aux animaux domestiques ou à l'homme. Différentes stratégies et formulations ont été développées pour optimiser la transfection *in vivo* et l'expression des plasmides ainsi que leur immunogénicité après injection dans la peau ou le muscle. La peau est riche en cellules présentatrices d'antigènes (APC) et en vaisseaux lymphatiques et c'est un organe facile d'accès. La peau de porc présente de nombreuses similitudes de structure et de composition en phagocytes mononucléés avec la peau humaine. Ce modèle préclinique est idéal pour transposer les résultats à l'homme ou pour des applications vétérinaires.

Dans cette partie, notre objectif était d'identifier un mode d'administration d'ADN optimal pour induire des réponses immunes contre le PRRSV-1 chez le porc et notamment des réponses lymphocytaires T. En effet, comme présentées dans l'introduction, les réponses lymphocytaires T sont proposées comme effectrices de la protection anti-PRRSV et elles pourraient induire des réponses cross-protectrices entre souches. En effet différents antigènes présentent des épitopes T conservés qui sont des candidats vaccins intéressants. Dans les parties suivantes de ce travail, nous envisagerons de cibler ces antigènes aux APC, ce qui nécessite que l'antigène puisse être sécrété par la cellule transfectée pour interagir avec un récepteur des APC. En conséquence, nous avons choisi des antigènes dénués de motifs transmembranaires. Les antigènes T candidats sélectionnés sont donc nsp1 β , l'ARN polymérase (RdRp) et M que nous avons incluse dans une construction chimérique GP4-GP5-M qui a été utilisée par une autre équipe (**Subramaniam et al. 2014**, cf. partie VII.). Enfin nous avons également sélectionné l'antigène N, qui est l'antigène B immunodominant, bien conservé entre souches, nous permettant d'évaluer l'efficacité de nos stratégies pour induire des réponses B.

Nous avons comparé l'immunogénicité de différentes méthodes d'administration des plasmides combinés avec un plasmide adjuvant codant pour le GM-CSF porcin dans la peau de porc : des injections intradermiques suivies d'électroporation en surface (EP), des EP avec des plasmides associés à des formulations de nanoparticules de PLGA NP (EP+NP), des injections intradermiques avec des plasmides associés aux PLGA NP (ID+NP), des patches composés de micro-aiguilles solubles contenant les plasmides associés aux PLGA NP (DMN) et deux applications des DMN suivi par un boost en EP (DMN/EP). L'intérêt de ces modes

d'administration a été présenté dans l'introduction de la thèse et étudié principalement dans le modèle murin. L'originalité de ce travail est d'évaluer ces modes dans un modèle plus pertinent que la souris en vue d'applications pour la vaccination du porc, en l'occurrence ici le PRRSV, et aussi pour la vaccination chez l'homme.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de transfection d'un plasmide codant pour la luciférase (pLuc) dans la peau de porc et nous avons analysé les réponses inflammatoires locales induites par les différentes stratégies d'injection. Nous avons montré que pLuc est exprimé dans les cellules de la peau de porc suite à EP et DMN, sans amélioration de la transfection in vivo par les PLGA NP. Les différentes stratégies d'injection n'affectent ni le nombre de cellules totales dans les biopsies de peau récoltées 24 heures après l'administration de pLuc, ni la mortalité cellulaire. EP et EP+NP ont induit l'accumulation de granulocytes et des cellules CMH class II^{pos} CD163^{pos} (monocyte/macrophages) dans les biopsies, avec une sécrétion d'IL-8 et d'IL-1 β . Par contre la proportion des cellules cDC1, cDC2 et LC dans les biopsies était réduite après EP, et de façon plus marquée après NP+EP pour les cDC. Dans nos conditions d'études, les biopsies des porcs DMN et DMN+NP n'ont pas présenté de modifications en composition cellulaire ni en production de cytokines. Ces résultats suggèrent l'hypothèse qu'EP induit une mobilisation des cDC et LC vers les ganglions et un recrutement de cellules inflammatoires dans le derme, la mobilisation des cDC étant renforcée par les PLGA NP.

Nous avons montré que nos plasmides étaient exprimés dans des cellules 293T, puis nous avons essayé d'analyser les protéines produites par western blot. Nous avons évalué chez des porcs âgés de 2 mois (42 répartis en 6 groupes), l'immunogénicité des plasmides. Les stratégies EP et EP+NP ont induit une réponse humorale IgG anti-N dans les séras et les sécrétions nasales contrairement aux stratégies ID+NP, DMN et DMN/EP. Les cellules de rate des porcs ont été stimulées avec des peptides chevauchants de 20 mers (décalage de 8 acides aminés entre peptides) recouvrant les séquences des antigènes candidats. En fonction de la taille des antigènes, différents pools de peptides ont été utilisés (20 peptides par pool environ). EP et EP+NP ont induit des réponses lymphocytaires IFN γ notamment anti-RdRp et anti-N. Le niveau des réponses et surtout le nombre de pools de peptides reconnus par porc se sont montrés plus importants avec EP+NP. Les réponses lymphocytaires T dans les groupes ID+NP et DMN se sont révélées très faibles. Par conséquent, nous avons choisi la stratégie d'EP+NP pour administrer des vaccins à ADN chez le porc dans l'étude suivante. Ainsi à la différence de la souris, les patches DMN ne sont pas efficaces chez le porc. Nos résultats

concernant la réponse inflammatoire suggèrent qu'il faudrait associer un effet adjuvant inflammatoire aux DMN.

L'emploi des patches à micro-aiguilles solubles était proposé par un partenaire du projet européen SAPHIR dans lequel s'inscrit ce travail (XEOLAS, Irlande). Les formulations PLGA NP ont été produites par un partenaire suisse (équipe de Nicolas Collin et Christophe Barnier-Quer, Université de Lausanne). Dans ce travail, j'ai participé à l'administration aux porcs (unité Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI) Jouy-en-Josas, et Plate-Forme d'Infection Expérimentale (PFIE) de Nouzilly) et à la collecte des prélèvements. J'ai analysé l'expression des plasmides in vitro et in vivo. Le dosage des cytokines en multiplex a été faite par Fany Blanc. Les ELISA et les productions de plasmides ont été partagées avec Céline Urien et l'analyse des populations de phagocytes mononucléés en cytométrie avec Isabelle Schwartz. J'ai pris en charge totalement l'analyse des réponses lymphocytaires IFN γ .

J'ai contribué à la mise en forme des résultats de l'article.

Assessing the immunogenic properties of DNA vaccines delivered with nanoparticles, electroporation and dissolvable microneedle patches in pig skin

Cindy Bernelin-Cottet¹, Céline Urien¹, Joanne McCaffrey^{2,3}, Damien Collin^{2,3}, Dennis McDaid³, Virginie Jakob⁴, Christophe Barnier-Quer⁴, Nicolas Collin⁴, Edwige Bouguyon¹, Elise Bordet¹, Céline Barc⁵, Olivier Boulesteix⁵, Jean-Jacques Leplat⁶, Fany Blanc⁶, Vanessa Contreras⁷, Nicolas Bertho¹, Anne Moore², Isabelle Schwartz-Cornil¹

¹VIM-INRA-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

²School of Pharmacy, University College Cork, Cork, Ireland; Department of Pharmacology, University College Cork, Cork, Ireland

³Xeolas, Dublin, Ireland

⁴Vaccine Formulation Laboratory, University of Lausanne, Chemin des Boveresses 155, 1066 Epalinges, Switzerland.

⁵INRA, UE1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, PFIE, 37380 Nouzilly, France

⁶GABI-INRA-AgroParisTech-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁷CEA-Université Paris Sud-INSERM, U1184 « Immunology of viral infections and auto immune diseases », IDMIT department, IBFJ, 92260 Fontenay-aux-Roses & 94270 Kremlin-Bicêtre, France

Abstract

DNA vaccines have demonstrated high efficacy in the mouse preclinical model using different modalities of formulation and delivery. As skin is a readily accessible tissue rich in antigen presenting cells and pig skin is a relevant model for humans, we evaluated different modes of DNA delivery in vivo in pig skin, i.e. surface electroporation (EP) and dissolvable microneedle patches (DMN), and we assessed the benefit of DNA combination to cationic poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles (NPs). We used plasmids encoding for luciferase (pLuc) as a marker DNA and vaccine plasmids encoding antigens from the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), an arterivirus responsible for major economic losses in swine. All methods were successful at inducing luciferase expression in skin. At 24 hours post administration, EP, but not DMN, induced a strong recruitment of granulocytes and monocyte/macrophage cells in the skin, a reduction of conventional dendritic cell subsets (cDC1 and cDC2) and of Langerhans cell representation, in association to local production of IL-1 β and IL-8. Substantial T cell responses against the PRRSV antigens were induced upon delivery with EP and very weak responses with DMN. Notably we obtained the strongest and broadest IFN γ -T response against a panel of PRRSV antigens with DNA combined to NPs and delivered by EP. Good systemic and mucosal IgG responses were induced by EP but not by DMN delivery. These results contrast with the immunogenicity efficacy previously reached in mice with DMN. Altogether, successful DNA vaccine administration in skin can be achieved in pigs with electroporation and patches, but only the former, especially when used in combination with NPs, induces local inflammation, humoral and cellular immunity. This finding shows the importance of evaluating the delivery and immunogenicity of DNA vaccines beyond the mouse model in a preclinical model relevant to human such as pig and suggests that the insufficient local inflammation triggered by the DMN-based administration of DNA is an underlying cause of their limited immunogenicity.

Introduction

DNA vaccination is an attractive strategy, presenting many advantageous properties, including a good safety profile due to lack of infectious risk, heat-stability, adaptability to pandemic strains, and ease of rapid and large-scale production. Whereas the high immunogenicity of naked DNA has been demonstrated in many instances in mouse models, immunogenicity revealed to be only suboptimal in human and domestic animals. In order to bypass this limitation, several delivery and formulation methods have been developed to improve the DNA plasmid expression upon injection in skin and muscle and immunogenicity. Among these, electroporation (EP) appears to have generated the biggest advance in the field (Saade and Petrovsky 2012; Tregoning and Kinnear 2014; Gothelf and Gehl 2012): the applied current induces pores in the cell membrane and directs the DNA through the cell towards the positive electrode, and the local inflammation, possibly elicited by cell damage, has been associated to the induction of adaptive immune responses in different species including mice, pigs and non-human primates (Schultheis et al. 2018; Calvet, Andre, and Mir 2014; Babiuk et al. 2004; Todorova et al. 2017). Importantly, different EP devices have been developed to deliver the DNA in muscle and skin with good results in preclinical models and in clinical trials (Tregoning and Kinnear 2014). The immuno-competence of the skin with its richness in antigen-presenting cells and dermal lymphatic vessels, as well as its easy access, make skin an organ of choice for DNA vaccine delivery. In addition, EP can be performed at the skin surface and is less invasive and painful as compared to in muscle (Todorova et al. 2017; Gothelf and Gehl 2012). Yet, EP is coupled to delivery by needle in skin and it induces discomfort and pain; therefore, other methods, based on different types of microneedles, have been developed. Microneedles (MN) are sharp microprojections that pierce the stratum corneum and deliver DNA to skin cells, without stimulating pain receptors or affecting blood vessels. Different designs include solid MN (Mikszta et al. 2002), coated MN (Gill et al. 2010), and lately, dissolvable MN (DMN) (Marshall, Sahn, and Moore 2016; Cole et al. 2018). These MN-based methods were shown to be efficient at promoting gene transfer, expression of antigens, and immune responses in mouse models (Mikszta et al. 2002; Gill et al. 2010; Marshall, Sahn, and Moore 2016; Cole et al. 2018). However, very few studies document the potency of DNA vaccines delivered by MN in larger species (Arya et al. 2016; Ma et al. 2014) despite the demonstration of efficient material and gene transfer in ex vivo cadaver skin (McGrath et al. 2014; Dul et al. 2017). To our knowledge, no studies have examined the immunogenicity of DNA vaccines delivered by MN to pigs. Dissolvable MN

(DMN) encapsulate the vaccine in their matrix that they release after skin insertion due to dissolution of the microneedle in the hydrated skin tissue, and they are fully biocompatible, stable and easy to use (Qiu et al. 2016; Cole et al. 2018). Interestingly, one of our recent studies showed that DMN with incorporated trivalent inactivated influenza vaccine elicited higher and broader immunity compared to intramuscular injection in mice (Vrdoljak et al. 2016). In the case of DNA delivery with DMN, CTL and B cell responses were induced against papillomavirus antigens in mice (Cole et al. 2018). However, the studies with DNA delivered by MN were performed in the mouse model and, although promising, they do not preclude that similar results would be obtained in application species. Pigs are the most appropriate animal model for human skin (Simon and Maibach 2000) as pig skin shares structural and histological features with human skin, and we previously described similarities in the composition of mononuclear phagocyte subsets (Marquet et al. 2014). Therefore, pig is a highly relevant preclinical model for assessments of DNA vaccine delivery strategies in skin both for translation to human and possible veterinary application for improving livestock health and welfare.

In this study, we evaluated the gene transfer and immunogenicity induced by DMN loaded with DNA that we compared to the gene transfer and immunogenicity induced by surface EP in pigs. The DNA vaccine encoded antigens from a pig arterivirus, the porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) which is the most damaging virus in swine worldwide (Lunney et al. 2016). The plasmid DNA was used either plain or coated on cationic poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles (NPs), which were previously shown to promote DNA vaccine efficacy in mice when coupled to MN (Kumar et al. 2012) or even to EP (Barbon et al. 2010). Previous studies indicated that DNA vaccine immunogenicity results from the combined effect of gene expression efficiency and local inflammation, which is induced by the delivery method as electrical pulses applied prior to intradermal injection promote the immune response (Babiuk et al. 2004; Barbon et al. 2010). Therefore, we also evaluated the gene transfer efficiency and the local inflammation induced by surface EP and DMN with DNA combined or not to cationic PLGA NPs in order to get insight into the parameters involved in immunogenicity. Altogether we found that all methods induced skin cell transduction. Only EP induced local inflammation with mobilization of monocyte/macrophage cells and dendritic cells. EP, especially when combined to cationic PLGA NPs, triggered substantial B and T cells responses. Although DMN induced significant

transgene expression, it induced very weak IFN γ T cell response and no detectable antibody response, in the absence of local inflammation.

Materials and Methods

Antibodies

The anti-pig IFN γ mouse P2G10 mAb (capture) and biotinylated anti-pig IFN γ P2G11 mAb were from MabTech AB (Nacka Strand, Sweden). The anti-pig IgA mouse mAb K61-1B4 was bought from Bio-Rad Antibodies. The anti-pig MHC class II mAb (mouse IgG2a, clone MSA3), anti-CD172a (mouse IgG2b, clone 74-22-15a) were purchased from the mAb Center Washington State University (USA). The in-house produced anti-pig CD13 mAb (mouse IgG1, clone T35) were purified from mouse ascites using protein A chromatography (Delmas et al. 1992). The biotinylated mAb anti-human langerin (rat IgG2a, clone 929F3) was obtained from Dendritics (France). Irrelevant unconjugated mouse IgG1, IgG2a and IgG2b, biotinylated rat IgG2a, Alexa 488-conjugated mouse IgG2a and PE-conjugated mouse IgG1 (Bio-Rad Antibodies) were used as isotype controls. The anti-6xHis rabbit polyclonal IgG was purchased from Abcam. The phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD163 mAb (mouse IgG1, clone 2A10/11), Alexa 488 (A488)-conjugated anti-granulocytes (mouse IgG2a, clone 6D10) and A488-streptavidin were bought from Bio-Rad Antibodies. A647-conjugated goat anti-rabbit IgG were bought from Jackson ImmunoResearch (USA). A647-conjugated goat anti-mouse (GAM) IgG2a, EF710 PerCP5.5-conjugated GAM IgG1 and APC-Cy7-conjugated GAM IgG2b were purchased from Fisher Scientific. The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody was purchased from Sigma-Aldrich and the HRP-conjugated rat anti-mouse IgG1 from BD-bioscience.

Preparation of cationic poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles (NPs) and coating with DNA

The nanoparticles (NPs) were prepared as follows: the PLGA RG502H polymer (Sigma), was dissolved in methylene chloride as a 5% (w/v) solution and 1 ml was emulsified in with 0.1 mL of Tris 5 mM pH7.4 at high speed using a probe sonicator. The primary emulsion was then added to 5 mL of distilled water containing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (0.5%, w/v). The resulting PLGA-CTAB nanoparticles were washed once in buffer by centrifugation at 10,000g. After preparation, washing, and collection, DNA was adsorbed onto the nanoparticles. Given the constraints of the DMN preparation (see below), 400 μ g DNA had to be loaded on NPs in 73 μ L buffer for making each 9 cm² patch.

Production of dissolvable microneedle patches

DMN patch contained 225 microneedles in a 9 cm² area (**Figure 1**). They were prepared as previously described (Vrdoljak et al. 2016), using 11% (w/v) trehalose and 1.25% (w/v) PVA as excipients. Microneedles were 500 µm in height and the formulation was dispersed throughout the full volume of the microneedle pore. Briefly, formulation was delivered directly onto the water-filled microneedle cavities in a polydimethylsiloxane (PDMS) mould at a rate of 1 - 3 µL/min. Formulation in the moulds was dried overnight at room temperature and then pulled from the mould onto medical grade adhesive tape (1525 L Poly Med tape, 3 M). A scoring system was to grade the physical quality of 1 cm² patch units; a patch with a score of 100 reflected a patch where all 25 microneedles per 1cm² were perfectly formed. A score of 92 (maximum of 2 missing microneedles) per 1 cm² was set as the lower limit of acceptability. The total dose of DNA plasmid, with and without NPs, per patch was set to 400 µg. The effective dose per patch was controlled by nanodrop. The quality of the plasmid in the patch compared to the liquid stock was determined by agarose gels (data not shown).

Construction and production of plasmids

The plasmid encoding for porcine GM-CSF (pGM-CSF) has been previously described (Somasundaram et al. 1999). A mCherry encoding plasmid (pmCherry2-N1, here referred to pmCherry) was obtained from Addgene under MTA. A firefly luciferase expression plasmid (pLuc) was kindly provided by Stéphane Biacchesi (INRA, France). The pLuc plasmid includes the eGFP and firefly luciferase sequences separated by a viral IRES cloned in a pcDNA3.1 expression vector. pcDNA3.1 vectors encoding for four PRRSV antigen sequences from the 13V091 isolate were synthesised by GeneArt. The antigen sequences were i) a GP4GP5M chimera that was derived from (Subramaniam et al. 2014) and transposed to the 13V091 viral sequence (1008 nt), ii) NSP1β (1176 nt), iii) RdRp (1962 nt), and iv) N (405 nt). In the case of NSP1β and RdRp which are naturally synthesised from viral polyprotein precursors (ORF1 and 2), an exogenous kozak sequence was added. Only GP4GP5M is expected to be secreted as includes the natural leader peptide of GP4. Each antigen sequence was terminated by a 6xHis tag. The plasmids are named pGP4GP5M, pN, pNSP1β, and pRdRp. Plasmid productions for immunization were prepared using Endofree® Plasmid Giga Kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and were stored at -20°C until use.

Plasmid transfection in vitro

293T cells were cultivated in DMEM + 5% fetal calf serum (FCS). 293T cells (1.8×10^5) were plated and transfected in P12-well plates with 1 µg of each PRRSV antigen coding plasmid, with a control pcDNA3.1 plasmid encoding for an irrelevant antigen, and a marker

plasmid (pmCherry, transfection control) using Fugene HD (Roche), according to the manufacturer recommendations. After 2 days, cells were harvested and processed for detection of expressed antigen by immunofluorescence or Western Blot.

Cell lysate and Western blots

Transfected 293T cells from 2 transfected P12-well plates were lysed in RIPA buffer 150 mM sodium chloride, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate 0.1% SDS 50 mM Tris 5 mM EDTA and a protease inhibitor cocktail, pH 8.0 at 4°C. Protein dosage was done with a Bradford assay against a bovine serum albumin (BSA) standard in RIPA. Cell lysates (5 to 20 µg) were analyzed by Western Blot following a 12% SDS-PAGE under reducing conditions. Blots were washed with PBS + 0.05% Tween 20 and incubated overnight at 4°C with anti-6xHis rabbit IgG at a 1:5000 dilution in PBS + 3% BSA + Tween 0.3% (w/v) followed by HRP-conjugated anti-rabbit antibody at a 1:100000 dilution in PBS + 3% BSA + Tween 0.3% overnight at 4°C. Immunoreactive bands were visualized with ECL substrate (SuperSignal™ West Femto, Thermofisher) according to the manufacturer's protocol. Image acquisitions were done with Chemidoc imaging system (Bio-rad).

Staining of cells and flow cytometry analysis

Skin cells were incubated on ice with PBS supplemented with 5 % horse serum and 5 % pig serum for 30 min. Cells were first labeled with a mix of primary monoclonal antibodies (mAb, 2 µg/ml) for 30 min, i.e. anti-MHC class II + anti-CD172a + anti-CD13 mAbs followed by EF710-PerCP5.5-conjugated GAM IgG1 + A647-conjugated GAM IgG2a + APC-Cy7-conjugated GAM IgG2b. After washing, secondary antibodies were saturated by an excess of mouse IgG1 and IgG2a (50 µg/mL) and finally labelled with PE-conjugated anti-CD163 and A488-conjugated anti-pig granulocytes mAb. Appropriate isotype control mAbs were used. Dead cells were excluded by DAPI staining. In order to detect intracellular langerin, cells were first incubated with live/dead cell viability reagent (1/50, Thermofisher Scientific) and labelled as described above with anti-MHC class II + anti-CD172a mAbs followed by their conjugates, and finally with PE-conjugated anti-CD163 mAb. After wash, they were fixed and permeabilized using the Cytfix and Cytoperm kit (Becton Dickinson), and further incubated with biotinylated anti-langerin or control biotinylated isotype and finally with A488-streptavidin. After 48-hour transfection, 293T cells were harvested in 2 mM EDTA and fixed and permeabilised using the Cytfix and Cytoperm kit. They were then incubated with rabbit anti-6xHis (5 µg/ml) followed by A647-conjugated goat anti-rabbit IgG. Flow cytometry acquisitions were done with a LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and results were analyzed using FlowJo 10.0.6 software.

Pig studies

The piglets' mothers were checked to be PRRSV-seronegative with the commercial ELISA.

The experiments with the pLuc plasmid (skin cell transduction and local inflammation) were approved by the COMETHEA ethic committee under the number APAFIS#13195-2017120408328722 v2 in accordance with national guidelines on animal use and performed at the Animal Genetics and Integrative Biology unit (GABI-INRA), France, under the accreditation number for animal experimentation C78-719. Large White pigs (10 weeks of age) were obtained from INRA UEPR Rennes-Saint Gilles. The immunisation experiments with PRRSV antigen-encoding plasmids was approved by the Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Val de Loire under the number APAFIS#4 13-20 15051418327338 v8 and were done at the Plateforme d'infection Expérimentale PFIE-INRA, Nouzilly, France, under the accreditation number for animal experimentation C37-1753 under A-BSL1 containment. Large White pigs (41 pigs, 4-week-old) were obtained from the INRA conventional breeding unit Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière PAO-INRA, Nouzilly, France.

In vivo plasmid transfection for assessment of vector expression and local inflammation in pig skin

Pigs were anesthetized (2% isoflurane) to avoid animal discomfort with electroporation (EP) and to optimally control the quality of vaccine administration. Pig skin in the inguinal zone for surface EP and in the lower thoracic zone for DMN application was cleaned with Vetedine soap (Vetoquinol), washed and dried. The DMN pLuc patches (9 cm², 400 µg DNA, plain DNA or adsorbed on cationic PLGA NPs) were placed on the skin under a 20 N force pressure for one minute. The pig flanks were then wrapped with Elastoplast to permit the maintenance of the patches on the skin for 24h. For surface EP, intradermal injection of pLuc (in 100 µL saline, plain or adsorbed on NPs) was done in the inguinal zone and EP was performed on the site of injection using the CUY 21 EDIT system (NEPA Gene, Japan). When stated, pGM-CSF was combined to pLuc (20 µg and 80 µg respectively). Disk electrodes (10 mm) were loaded with conductive gel (Alcyon, France) and 6 electric pulses were applied during 10 ms with 90 ms interval. Trolamine 0.6% (Biafine, France) was spread on the transfected zone right after administration.

After 24 h, pigs were euthanized and skin biopsies were collected using a 8 mm diameter disposable biopsy punch (Kai medical, Japan) after cleaning of the skin with Vetedine soap and Vetedine 10% solution. Control skin was harvested from the same zone (inguinal for the EP and thoracic zone for the DMN). For evaluation of transfection efficacy, each biopsy was

cut into small pieces and lysed with 150 μ L of lysis reagent (Luciferase Assay System E1500, Promega). Bioluminescence was measured per each biopsy using the In Vivo Imaging System (IVIS-200, Xenogen, UK) after adding 100 μ l luciferine substrate. A region of interest (ROI) was manually selected and the intensity of luminescence (photons/sec/cm²) was recorded. For cytokine production assessment, each biopsy was carefully washed in PBS and placed in RPMI + 10% FCS + 1 % antibiotic/antimycotic cocktail for 24h. For assessment of inflammatory cell mobilization, 6 biopsies were collected per condition, washed in PBS, pooled, minced and digested overnight in 6 ml RPMI + 10% FCS + collagenase D (1mg/ml, Roche) + dispase (0.5mg/mL, InVitrogen) + DNase (0.5mg/mL, InVitrogen), + antimycotic antibiotic cocktail. The skin fragments were gently grinded with a 5 ml plunger through a metal wire mesh and the cell suspension was finally filtered through 100- μ m pores-nylon mesh filters.

In order to evaluate the voltage per cm (V/cm) parameter leading to optimal transfection in pig skin, the injected skin areas were subjected to EP with escalating pulses from 0 to 830 V/cm. in that case, skin was collected after 48 hours. The optimal V/cm was 670 V/cm and was used in all subsequent experiments (**supplementary material 1**).

Immunizations and sample collections

Five groups of 7 weaned pigs (28 days-old, 3 or 4 males and 3 or 4 females per group) were immunised as follows: intradermally with DNA on PLGA nanoparticles (ID+NP), intradermally with plain DNA and surface electroporation (EP), intradermally with DNA on nanoparticles and surface electroporation (EP+NP), with DMN (DMN), and with DMN plus a final EP boost (DMN/EP). A group of 6 pigs were kept as controls. The electric pulses were set at 670 V/cm and the DMN were applied on the lower thoracic area as described for pLuc above. For the ID+NP, EP and EP+NP, each PRRSV antigen encoding plasmid (320 μ g) + pGM-CSF (80 μ g) mixed in a final 400 μ L volume of 0.9 % NaCl was inoculated in 4 intradermal spots (100 μ l each) under general anesthesia. Each pig of the ID+NP, EP, EP+NP and DMN group received 3 identical administrations, 4 weeks apart; the DMN/EP received 2 DMN applications and a final EP boost, 4 weeks apart. Sera were harvested on D0, 35, 64, 84. Nasal swabs from the 2 nostrils were collected in PBS + antiprotease cocktail at D0 and 84. Spleen was harvested on D84 and spleen cells were collected as described (Bernelin-Cottet et al. 2016). At the end of the study, the animals were euthanized by an overdose of sodium pentothal.

Overlapping peptides

Overlapping peptides (20 mers, offset 8) covering the NSP1 β , RdRp, N and the GP4GP5M PRRSV antigens were synthesized by Mimotopes (Mimotopes Pty Ltd, Victoria, Australia , <http://www.mimotopes.com>). Upon receipt, the peptides were diluted in H₂O:acetonitrile (50:50 vol) at a 5 mg/mL concentration and grouped as pools of peptides not exceeding 25 peptides: pool N (15 peptides), pool GP1 (from peptide 1 to 20 of the GP4GP5M chimera), pool GP2 (from peptide 21 to 40 of the GP4GP5M chimera), pool NSP1 β 1 (from peptide 1 to 22), pool NSP1 β 2 (from peptide 23 to 47), pool RdRp1 (peptide 1 to 20), pool RdRp2 (peptide 21 to 40), pool RdRp3 (peptide 41 to 60), pool RdRp4 (peptide 61 to 80). A 20-mer peptide from the HIV polymerase was used as control.

Evaluation of PRRSV antigen-specific T cell responses by ELISPOT

IFN γ -secreting T cells were detected using PVDF membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen®HTS, Millipore) coated with 15 μ g/mL anti-porcine IFN γ (capture mAb) in PBS. Spleen cells were suspended in X-VIVO-20 medium supplemented with 2% FCS, 100 U/ml penicillin and 1 μ g/ml streptomycin (culture medium) and 2×10^5 were plated per well. Cells were stimulated with the different pools of overlapping peptides described above at a 5 μ g/ml final concentration for 18 hours, in duplicates. A HIV polymerase-derived peptide and ConA at 25 μ g/ml were used as controls. Control wells with H₂O:acetonitrile were done. After 18h, the IFN γ -secreting cells were revealed by sequential incubations with 0.5 μ g/ml biotinylated anti-IFN γ followed by 0.5 μ g/mL alkaline phosphatase conjugated-streptavidin and 1-Step™ BCIP/NBT reagent. The spots were enumerated using the iSPOT reader from Autoimmun Diagnostica GmbH. Positive wells were considered if the spot numbers in the 2 PRRSV stimulated conditions were strictly superior to the spot numbers in the control peptide stimulated conditions as described (Chrun et al. 2018). The mean number of spots of stimulated minus control peptide was calculated.

Evaluation of anti-N IgG by ELISA

The sera and swab extracts were assayed using the Ingezim PRRS 2.0 kit (Ingenasa, Spain) at a 1:40 and 1:2 dilution respectively. S/P ratio were calculated as follows: [OD sample minus OD negative control]:[OD positive control minus OD negative control]. For IgA, area flat bottom polystyrene high bind microplates (Corning) were coated overnight at 4°C with 50 ng N recombinant protein (same preparation as in the Ingezim PRRSV 2.0 kit) in 50 μ l of PBS. Plates were saturated with 0.1% skim milk in PBS - 0.05 % Tween 20 for 2 h at 37°C. Samples were 2-fold serially diluted and were incubated for 2 h at 20°C. Antigen-bound IgA were detected using anti-pig IgA mAb (50 ng/ml) followed by HRP-conjugated rat anti-mouse IgG1 (500 ng/ml). All detection antibodies were incubated for 1 h at 37°C. The 1-

Step™ ULTRA-tetramethylbenzidine HRP substrate (TMB, Thermo-Scientific) was used and absorbance was measured at 405 nm.

Cytokine detection

Concentrations of IL-1 β and IL-8 were assessed by cytometric beads assay for simultaneous detection of 12 swine cytokines (IL-4, IFN α , TNF α , IL-2, IL-8, IL-13, IL-12, IL-6, IFN γ , IL-10, IL-17, IL-1 β) as described (Maisonnasse et al. 2016).

Statistical and correlation analysis

Data were analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software. The unpaired non-parametric bilateral Mann-Whitney test was used to compare the efficacies of the different V/cm for luciferase expression using compiled results from different pigs, and the IgG in sera and swab extracts. The one-way paired T test was used to compare the luciferase expression signals, the innate cytokine secretion, and the inflammatory cell mobilization using different mode of DNA delivery on the same pig. The Wilcoxon signed rank test was used to compare the T cell response versus the non-vaccinated group.

Results

Formulating DNA plasmids with nanoparticles (NPs)

The coating of the DNA on cationic PLGA NPs aimed at promoting DNA stability in extracellular fluid and during the intracellular trafficking to the nucleus and at favoring the capture by skin cells including mononuclear phagocytes for antigen presentation (Tregoning and Kinnear 2014; Kumar et al. 2012). In order to incorporate the desired amount of DNA in patches (see below), we used highly concentrated DNA solution formulated with various amounts of cationic PLGA NPs and observed that ratios equal and above 20:1 (20 μg DNA for 1 μg NPs) were required to avoid precipitation, with formulation's size measured between 120 and 140 nm, and PDI around 0.4. Besides, indications of the adsorption of the negatively charged pDNA to the surface of the cationic nanoparticles were given by a drop of the zeta potential after the addition of DNA (from +15/+30 mV to -30/-50 mV). However, the DNA loading ratio showed low levels of adsorptions, i.e. 15 % for the NPs with the 1:20 formulation, probably due to the low concentration of NPs in comparison to the excess of DNA.

DMN patches loaded with plain DNA or DNA combined to cationic PLGA NP

We incorporated 44 μg of total DNA plasmids per cm^2 patch, which is in the same order of magnitude as in previous studies with DNA delivery with patches where 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were used (Gill et al. 2010; Arya et al. 2016). These patches contained 225 needles per patch (**Figure 1A**), with 500 μm needle-height (**Figure 1B**), a total of 400 μg DNA per patch, and at a 1:20 NP:DNA ratio. The quality of the patches was high, as reflected in the DMN score reaching 100% while maximally loaded with plain DNA or DNA coated on cationic PLGA NPs. DMN patches were applied to the lower thoracic zone to permit a 20 N force to be applied for 1 minute to the skin and as a convenient site for securely placing the patch and an Elastoplast wrap which was kept for 24 hours. This skin thickness in this zone lays between 90 and 135 μm (not shown) and is therefore compatible with vaccine delivery through the epidermis with 500 μm -high needles. We previously characterised skin penetration events that occur in ex vivo pig skin with DMN administration (McGrath et al. 2014).

A



B

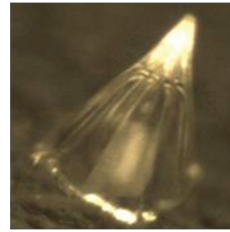


Figure 1. DNA-loaded dissolvable microneedle patches. (A). An image of a patch dosage unit. Each patch was 9 cm² and comprised of 225 microneedles. (B). An image of a single microneedle that is 500 μ m in height and has a base of 333 μ m diameter. DNA was loaded throughout the entire microneedle.

Transduction efficacy of pig skin cells upon DNA delivery with DMN and surface EP

We applied DMN patches loaded with 400 µg pLuc, plain or combined to cationic PLGA NPs, on the lower thoracic zone of three Large White pigs, as described in the Material and Methods. On the same pigs, pLuc (100 µg in 100 µL saline) was delivered in the inguinal skin by intradermal injection followed by surface EP, either as plain DNA or combined to cationic PLGA NPs, using the same formulation as for DMN. This DNA dose for EP was chosen based on our previous successful vaccination study in sheep using surface EP (Chrún et al. 2018). Skin biopsies were harvested after 24 hours and processed for detection of luciferase expression by bioluminescence measurement. This timing was selected as shown to be optimal by others (Yan et al. 2014). Control skin of same thoracic and inguinal zone was collected, because different skin zones can differ in their intrinsic luminescence. Indeed, the intrinsic luminescence revealed to be slightly lower (although not significantly) in the thoracic than in the inguinal zone (mean \pm sem = $3.85 \times 10^5 \pm 2.11 \times 10^5$ versus $5.69 \times 10^5 \pm 1.38 \times 10^5$ p/cm²/s/r respectively, **Figure 2**). The level of bioluminescence induced by the DMN loaded with plain DNA was significantly higher than the thoracic control and reached $2.89 \times 10^7 \pm 1.88 \times 10^7$ p/cm²/s/r (mean \pm sem). Coating NPs with DNA did not statistically change the level of bioluminescence from the one induced by DMN loaded with DNA (DMN+NP: $7.96 \times 10^7 \pm 9.31 \times 10^7$ p/cm²/s/r, **Figure 2**). The level of bioluminescence was the highest when pLuc was delivered with surface EP, reaching $1.3 \times 10^8 \pm 1.46 \times 10^7$ p/cm²/s/r (mean \pm sem). Again, DNA adsorption on cationic NPs did not enhance the luciferase expression ($1.1 \times 10^8 \pm 9.4 \times 10^7$ p/cm²/s/r (mean \pm sem), **Figure 2**). The optimal plasmid delivery V/cm parameter had been established beforehand on 4 test pigs, using escalating electric field values. A plateaued luciferase signal that did not induce local necrosis was obtained with the 670 V/cm parameter (**Supplementary material 1**) which was used for all the surface EP in this paper. In conclusion, skin cell transduction can be obtained with DNA-loaded DMN, to a relatively close level to the one obtained with surface EP, and is not improved by loading the DNA on cationic PLGA NPs in the conditions that we used.

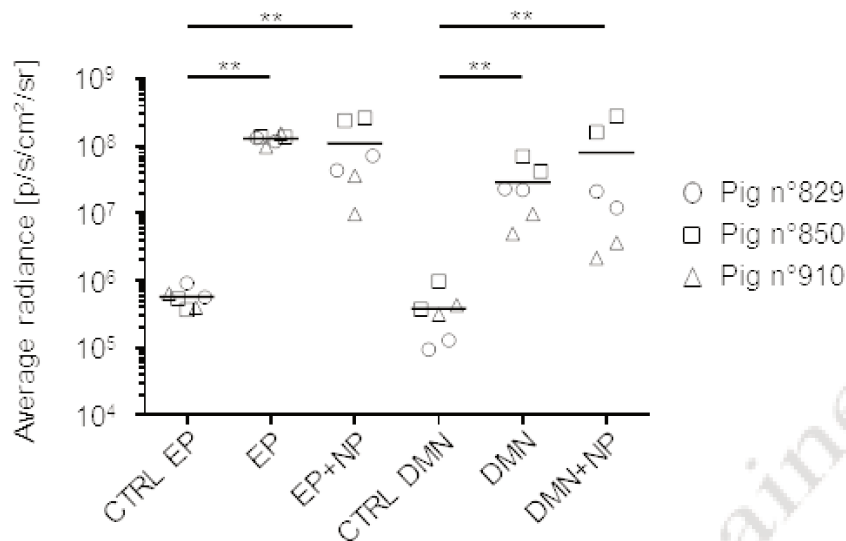


Figure 2. Expression of luciferase activity upon in vivo transfection of pig skin cells with pLuc delivered using surface EP and DMN patch application. Three Large White pigs (number 829, 850 and 910) were anesthetized. In the inguinal zone, 100 μ g pLuc, either plain or adsorbed on cationic PLGA NP (20:1, DNA:NP ratio) was injected intradermally and the skin site was subjected to surface EP as described in the material and methods (EP and EP+NP). Duplicate injections were done in each pig per condition. In the thoracic area, DMN patches loaded with pLuc plasmid (400 μ g per 9 cm² patch), either plain or adsorbed on cationic PLGA NP (20:1, DNA:NP ratio) were applied on the skin as described in the material and methods (DMN and DMN+NP). After 24 hours, 8 mm biopsies were harvested at the sites of administration and processed for luciferase activity detection. Control skin of the same respective sites (inguinal and lower thoracic) were collected and treated in parallel and are designated as CTRL EP and CTRL DMN respectively. The luciferase activity results (p/s/cm²/sr) of the transfected and control skin from pig 829, 850 and 910 are indicated by a distinct symbol (circle, square and triangle respectively). Significant differences between the injected sites and control sites were determined with the non-parametric Mann-Whitney test (**, $p < 0.01$).

Inflammatory cell mobilization induced by DNA delivery with DMN and surface EP in skin

The immunogenicity of plasmid DNA vaccines has been shown to be associated both to cell transduction and to inflammatory cell mobilization, which has been proposed to have an adjuvant effect (Babiuk et al. 2004; Todorova et al. 2017; Calvet, Andre, and Mir 2014). We therefore analysed the mononuclear phagocyte and granulocyte cell types in skin biopsies 24 hours after administration of plasmid with surface EP or DMN, with plain DNA or combined to cationic PLGA NPs. In order to relate these results to the immunogenicity experiment where pGM-CSF was used as a genetic adjuvant (see below), pLuc was combined to pGM-CSF (4:1, $\mu\text{g}:\mu\text{g}$ ratio). The mononuclear cell subsets were identified based on our previous work on swine skin dendritic cells and macrophages (Marquet et al. 2011; Marquet et al. 2014) and on others (Auray et al. 2016). The gating strategy is described in **Supplementary material 2** on cells from control skin (**A**) and surface EP (**B**) biopsies. Granulocytes were identified among MHC class II^{neg} cells as 6D10^{pos} cells. From our previous work (Marquet et al. 2014; Marquet et al. 2011), cDC and LC are expected to be found among MHC class II^{high} cells, with cDC1 and LC being CD163^{neg} and cDC2 being CD163^{int}: we therefore drew a MHC class II^{pos/high} CD163^{neg/int} cDC/LC gate, in which cells were split into CD172^{pos} and CD13^{pos} cells. CD13, which is a cDC1 marker in human, mice and pig, was used to identify cDC1 (Granot et al. 2017; Ghosh et al. 2012; Auray et al. 2016). We further split the CD172^{pos} cells into CD163^{int} and CD163^{neg} to identify cDC2 and LC respectively (Marquet et al. 2011). We confirmed that CD163^{neg} CD172^{high} cells are Langerin^{high} and correspond to LC (**Supplementary material 2, B and D**). The rest of the CD163^{int/pos} MHC class II^{pos} cells with exclusion of the MHC class II^{high} cells (cDC2), were designated as monocyte/macrophage cells (Marquet et al. 2014). Based on this gating, we analysed the percentage of each subset among live cells upon pLuc + pGM-CSF delivery. The total cell number per 6 biopsy pools and the percentage of live cells were not significantly affected by EP and tended to be increased by EP+NP (**Figure 3A and B**). Compared to control inguinal skin, surface EP induced a strong increase in the granulocyte and in the monocyte/macrophage cell populations and a decrease in the cDC2, cDC1 and LC representation (**Figure 3C**). This decrease is found in total cells and in live cells (DAPI^{neg}) and does not appear to correspond to a specific cell death induction in DC (**not shown**). As the total number of cells was not significantly modified by EP, the decrease in cDC2, cDC1 and LC representation is likely to correspond to mobilisation to lymph nodes. The use of

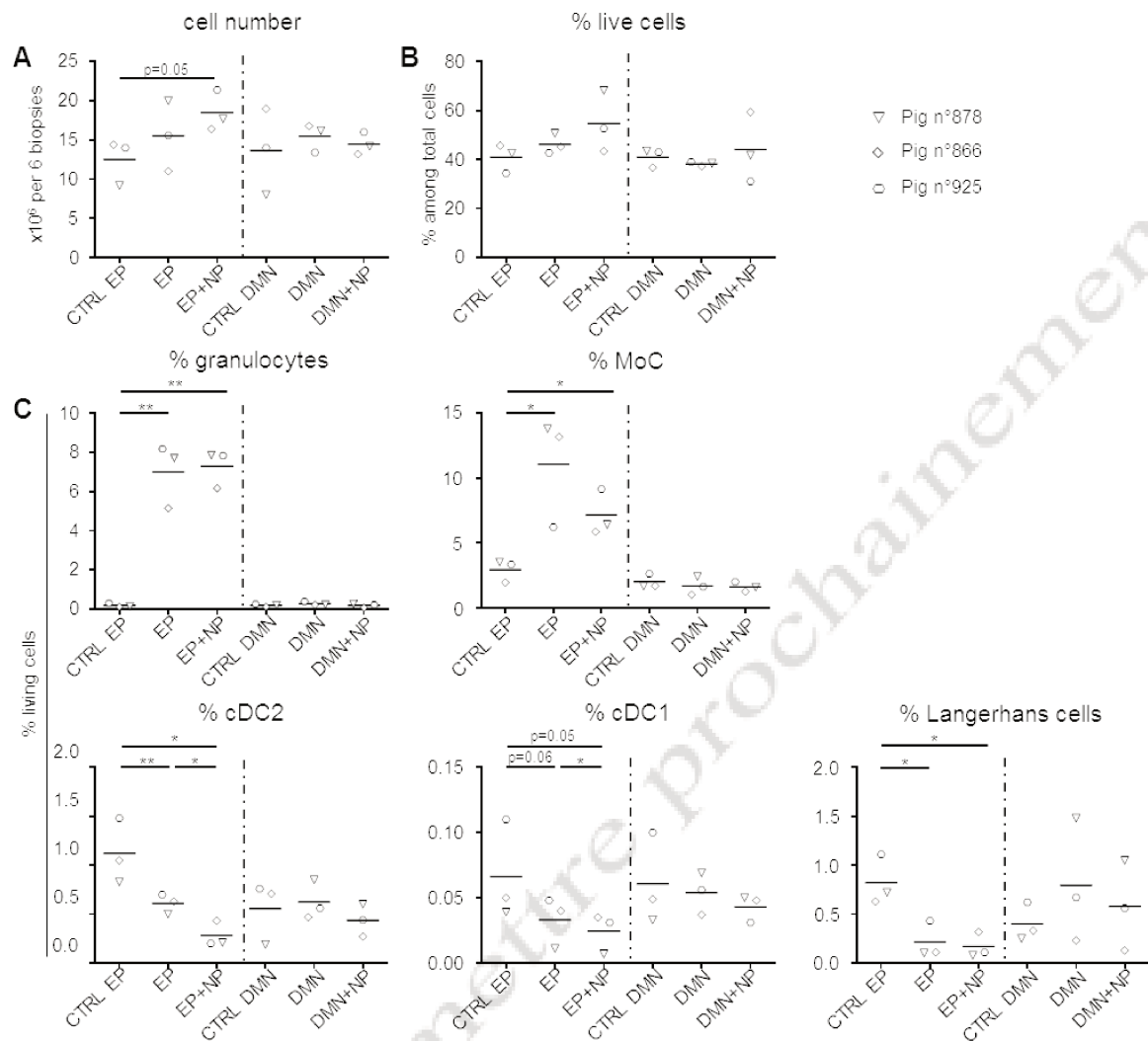


Figure 3. Myeloid cell mobilization upon administration of pLuc and pGM-CSF delivered in skin using surface EP and DMN patch application. Plasmids were administered as described in **Figure 2** in three Large White pigs (number 878, 866, 925) except that pGM-CSF was combined to pLuc (20 μ g pGM-CSF + 80 μ g pLuc in EP and 80 μ g pGM-CSF + 320 μ g pLuc in DMN). Six EP sites were pooled per condition and 6 biopsies were pooled from DMN patch sites and the biopsies were processed to skin cell isolation as described in the material and methods. **A.** The total cell number from the 6 biopsies are reported. **B.** The different subset representation (% out of live DAPIneg cells) are reported for the biopsies of the different administration methods, named as in **Figure 2**. **C.** The different cell subset % from pig 878, 866, 925 are indicated by a distinct symbol (triangle, diamond and hexagon respectively). Significant differences between the injected sites and control sites were determined with a unilateral paired t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

cationic PLGA NPs appeared to amplify the decrease in cDC representation in the case of EP+NP (**Figure 3C**). Conversely, DMN application did not result in significant change in mononuclear phagocytes and granulocytes representation.

Inflammatory cytokine synthesis in skin upon DNA delivery with DMN and surface EP

In order to further analyse the inflammation induced by the different DNA delivery methods, we harvested skin biopsies 24 hours after pLuc + pGM-CSF administration and placed 2 biopsies per condition in flotation in culture medium for 24 hours. The cytokine content was analyzed in a multiplex assay for the detection of 12 cytokines (IL-4, IFN α , TNF α , IL-2, IL-8, IL-13, IL-12, IL-6, IFN γ , IL-10, IL-17, IL1 β). Surface EP, with or without cationic PLGA NPs, tended to induce the secretion of IL-1 β , and of IL -8, and not of the other cytokines (**Figure 4 and data not shown**). DNA delivered by DMN did not induce detectable cytokine synthesis under these conditions (**Figure 4**). Similar results were obtained when pLuc only (without GM-CSF) was used for the delivery with EP (**supplementary material 3**). Therefore, the delivery of DNA with DMN allows gene transfer and expression in skin cells without detectable inflammatory response, whereas surface EP induces higher transgene expression, inflammatory cell mobilization, and inflammatory cytokine expression, with EP+NP further enhancing cDC mobilisation.

Immune responses induced by DNA vaccine delivery with DMN and surface EP

The next step was to evaluate the immunogenicity induced by the DNA delivery with DMN and surface EP. We produced plasmids encoding for antigens from PRRSV, a swine arterivirus. Four antigens were selected based on their T and B cell antigenicity: N is the immunodominant B cell antigen, and GP4GP5M, RdRp and NSP1 β include conserved T cell epitopes across distant viral strains (Subramaniam et al. 2017; Mokhtar et al. 2014). The PRRSV antigens (PRRSV-AG) sequences were end-terminated by a 6xHis tag and cloned in a pcDNA3.1 expression vector. The 4 PRRSV-AG vectors were transiently transfected in 293T cells and the 6xHis-tagged proteins were detected intracellularly by immunostaining and flow cytometry (**Figure 5**) and after cell lysis in RIPA buffer by Western Blot (**not shown**). Pigs were then immunised with 320 μ g of these vectors, each combined with 80 μ g pGM-CSF in 5 vaccinated groups and one non-vaccinated control group.

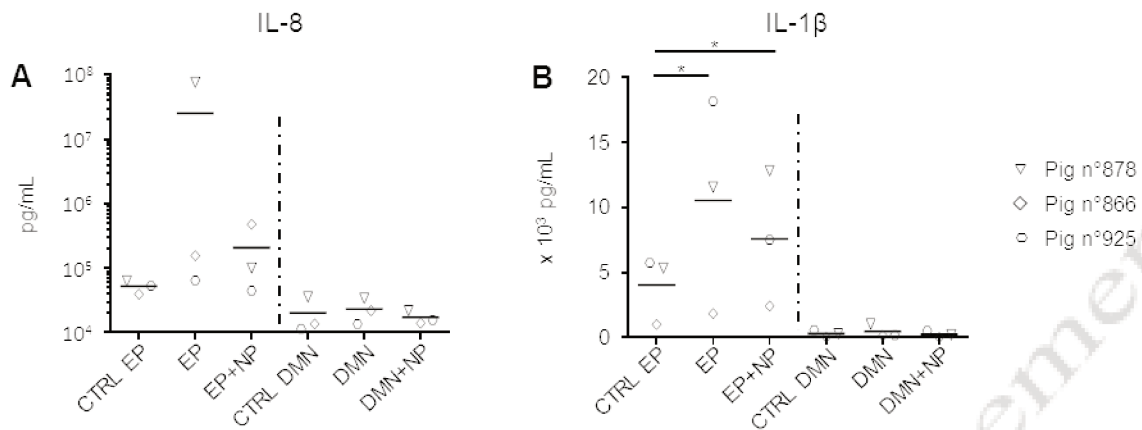


Figure 4. Inflammatory cytokine secretion upon administration of pLuc and pGM-CSF delivered in skin using surface EP and DMN patch application. Plasmids were administered as described in **Figure 3**. Twenty-four hours after, skin biopsies from 2 same injection types were aseptically collected, washed in PBS and placed in 1 ml RPMI + 10% FCS + 1 % antibiotic/antimycotic cocktail for 24h. Cytokines were detected using a multiplex cytometric bead assay and the cytokine concentration was evaluated using a standard curve with recombinant cytokines. Cytokines IL-8 **A.** and IL-1 β **B.** were detected. The cytokine concentration of biopsies from pig 878, 866, 925 are indicated by a distinct symbol (triangle, diamond and hexagon respectively). Significant differences between the injected sites and control sites were determined with a unilateral paired t-test (*, $p < 0.05$).

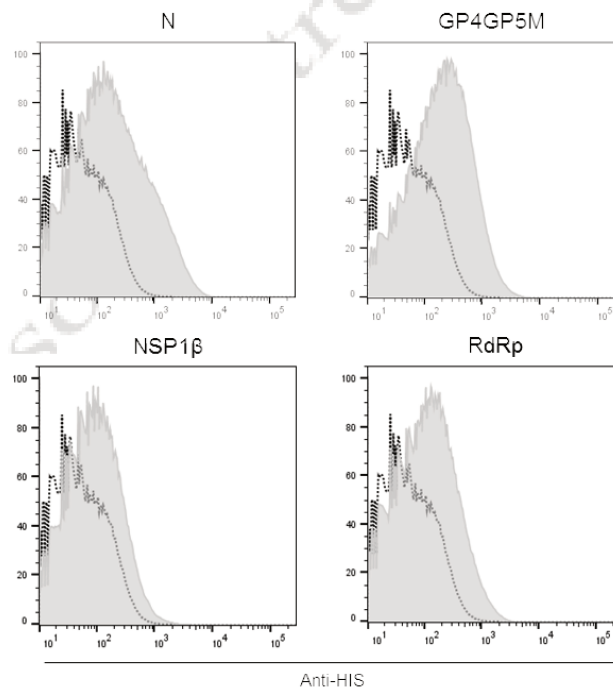


Figure 5. PRRSV antigen expression in 293T cells. 293T cells were transfected with control pcDNA3.1 or with pGP4GP5M, pN, pNSP1 β , and pRdRp. After 2 days, cells were either processed to intracellular detection of 6xHis tag using anti-6xHis rabbit polyclonal IgG followed by A647-conjugated goat anti-rabbit IgG (A) (see material and methods). The 6xHis tag signal in each transient PRRSV-AG transfected 293T (grey background) is overlaid on the signal from pcDNA3.1 transfected 293T cells (white background).

The vaccinated groups (7 pigs in vaccinated groups initially, 6 in the control group) included: a group receiving DNA with cationic PLGA NP directly injected in the dermis (ID+NP), a group receiving plasmids intradermally followed by surface EP with plain DNA (EP) and DNA adsorbed on cationic NPs (EP+NP), a group receiving DNA delivered by DMN with cationic PLGA NPs (DMN), and finally a group primed twice with DMN and finally boosted with EP (DMN/EP) (**Figure 6A-B**). There was one dead pig in the EP and ID+NP groups, due to anesthesia. The anti-N IgG levels were assayed from sera and nasal swab extracts using a commercial kit. Anti-N IgG were detectable at D35 and their levels further increased at D64 and D84, both in the EP and the EP+NP groups, and not in the DMN (**Figure 6C-E**). No effect of DNA adsorption on cationic NP was observed on the anti-N IgG response (**Figure 6C-E**). Low levels of anti-N IgG were detected in nasal swab extracts in the EP and EP+NP group (**Figure 6F**). Anti-N IgA could not be detected at D84, neither in sera nor in swab extracts.

The splenocytes were restimulated with overlapping peptide pools from the PRRSV-AG and the IFN γ -secreting cells were detected. Nine pools of maximum 25 peptides were used in order to stimulate splenocytes with 1 μ g of each peptide per well without toxicity (see Material and Methods). Non-specific responses in control pigs were obtained with the GP2 and NSP1 β pools, possibly due to cross reactivity of the TCR with unrelated T cell epitopes to which these pigs have been exposed, therefore these pools were not considered in the analysis. The proportion of pigs that respond to the N, GP1, and to the 4 RdRp peptide pools was higher in the vaccinated groups than in the control one (**Figure 7, table 1**): it reached a maximum of 1/6 in the control group with some pools, 3/7 in the DMN group (RdRp1, 2 and 4), 5/6 in the EP group (RdRp4), and 7/7 in the EP+NP group (RdRp4). A Wilcoxon signed rank test reveals statistically significant differences between the response magnitudes in the EP+NP and the control group only in the case of the RdRp1 and RdRp4 pools, and close to significance with the N and RdRp2 pool (**Figure 7**). No antigen was highly dominant compared to the other antigens; each animal demonstrated a unique hierarchy of antigen recognition, irrespective of vaccine. However, N, RdRp1 and RdRp4 induced the most consistent responses. For each pig, the number of peptide pools able to stimulate splenocytes was calculated and the proportion of pigs capable to respond to more than 2 peptide pools was 0/6 in the control group, 1/6 in the ID+NP, 1/7 in the DMN/EP group, 2/7 in the DMN group, 4/6 in the EP group and 5/7 in the EP+NP group. Altogether this immunogenicity analysis shows that DNA delivery with DMN induced very weak IFN γ T cell responses and no

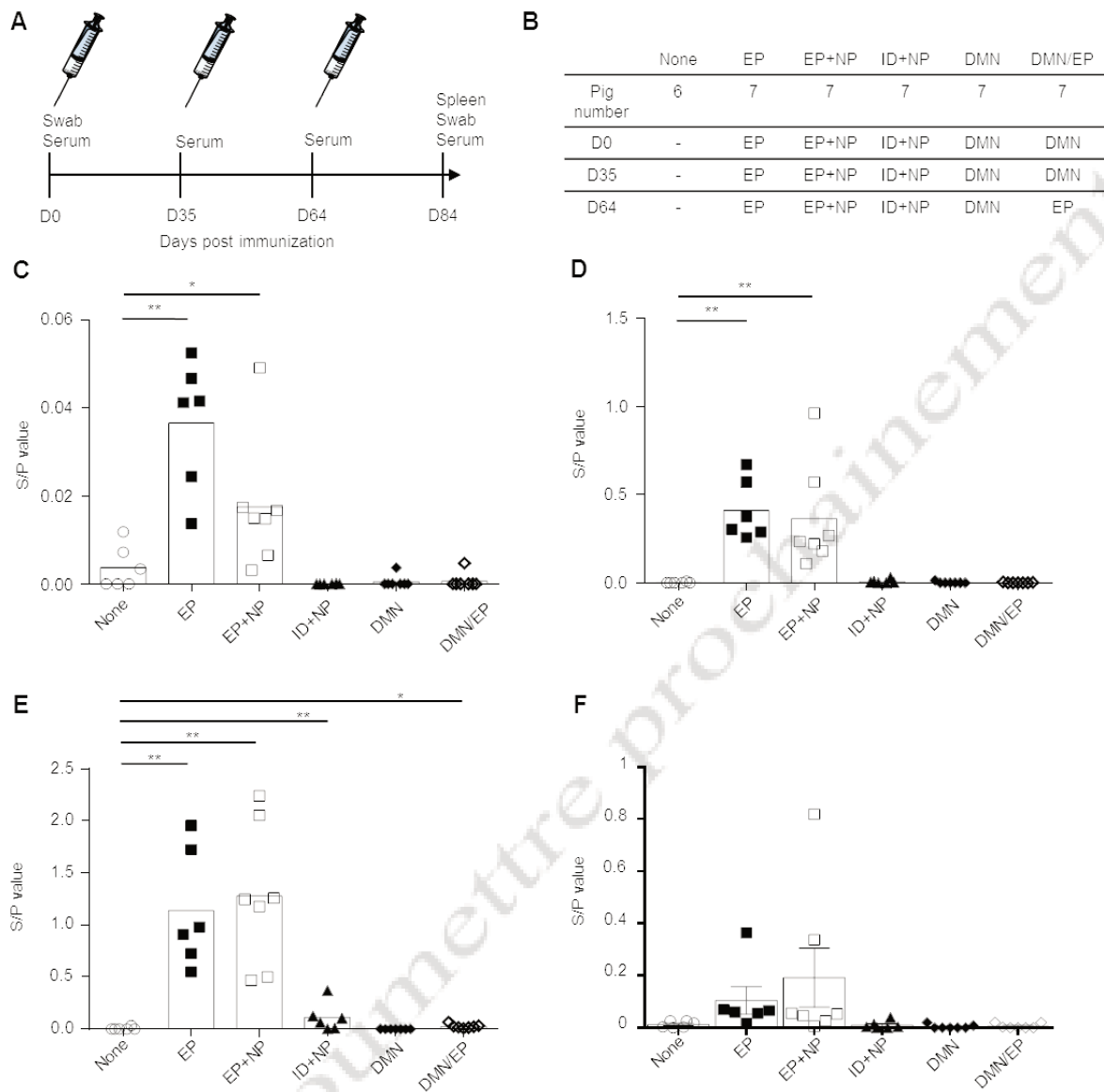


Figure 6. Detection of IgG in sera and nasal secretions from pigs immunized with pPRRSV-AG delivered using surface EP and DMN. **A.** Schematic representation of the immunization protocol of pigs with pPRRSV-AG + pGM-CSF. Each pig received 320 μ g of each pPRRSV-AG combined to 80 μ g pGM-CSF on day (D)0, 35 and 64 (see material and methods). Sera were collected at D0, 35, 64, 84, nasal swab at D0 and 84 and spleen cells were collected at D84. **B.** Table summarizing the 5 different vaccinated groups. Intradermal inoculations of plasmid coated on cationic PLGA NPs (ID+NP group), intradermal inoculations of plain DNA followed by EP (EP group), intradermal inoculations of plasmid coated on cationic PLGA NP followed by EP (EP+NP group), or plasmid delivered by DMN patch applications (DMN group) were performed on D0, D35 and D64. In the case of the DMN/EP group, plasmid DNA was delivered with DMN on D0 and D35 and with intradermal inoculation + EP on D63. **C-E.** The sera (1:40) from D35 (**C**), D64 (**D**) and D84 (**E**) were assayed for detection of anti-N IgG using the Ingezim PRRS 2.0 kit. S/P ratios were calculated as described in the Material and Methods. **F.** Nasal swab extracts (1:2) were assayed for detection of anti-N IgG using the Ingezim PRRS 2.0 kit on D84. Significant differences between the vaccinated groups and the control group were determined with the non-parametric Mann Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

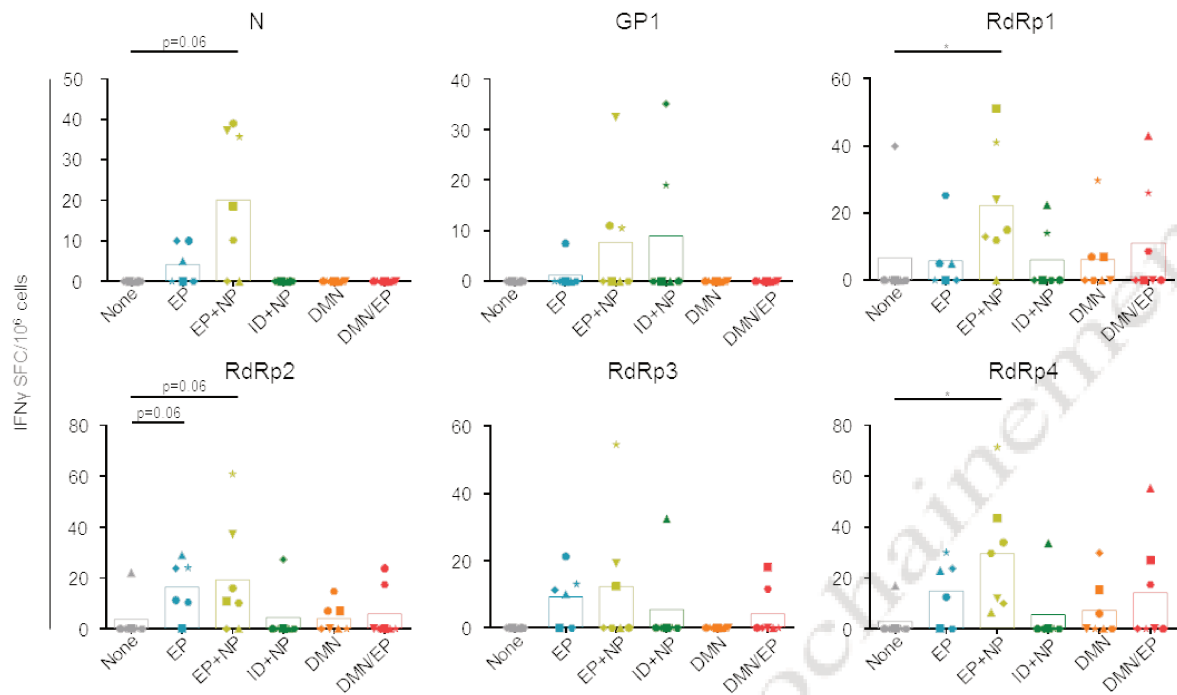


Figure 7. Detection of IFN γ -secreting cells in spleen from pigs immunized with pPRRSV-AG delivered using surface EP and DMN. Splenocytes (2.5×10^5) were plated in Multiscreen plates coated with a capture anti-porcine IFN γ mAb (duplicated wells) and re-stimulated for 18 hours with 5 μ g/ml of peptide pools made of < 25 overlapping peptides covering the N, pool GP1 (from peptide 1 to 20 of the GP4GP5M chimera), pool RdRp1 (peptide 1 to 20), pool RdRp2 (peptide 21 to 40), pool RdRp3 (peptide 41 to 60), pool RdRp4 (peptide 61 to 80). An irrelevant peptide (5 μ g/ml) or plain medium were used as controls. IFN γ spot forming cell (SFC) counts were considered PRRSV-AG-specific when both duplicated well values from cells stimulated with PRRSV peptides were strictly superior to the duplicated-well values from cells stimulated with the irrelevant peptide. The mean SFC number in stimulated wells minus the ones with irrelevant peptide wells are shown (net mean values). Each symbol in the graphs represents an individual animal and the same symbol is used across the peptide pool restimulation. The box plot is drawn on the mean values obtained with the different pigs. Significant differences between the vaccinated groups and the control group were determined with the non-parametric Wilcoxon test (*, $p < 0.05$).

detectable B cell response. The responses in the ID+NP and DMN/EP group were also very low. EP induced substantial IgG responses in all pigs and DNA adsorption on cationic PLGA NPs combined to EP promoted the magnitude and breadth of the IFN γ T cell responses.

Article à soumettre prochainement

Table 1: IFN γ -secreting T cells in the pPRRSV-AG vaccinated groups upon restimulation with overlapping peptide pools (N, GP1, RdRp1, RdRp2, RdRp3, RdRp4)

Vaccine	Pig N°	Peptide pools						Nb of stimulin g peptide pools/pig	% responding pigs to > 2 peptides/group
		N	GP1	RdRp1	RdRp2	RdRp3	RdRp4		
none	6	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	44	0	0	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	22	0	17	2	
	55	0	0	40	0	0	0	1	
	57	0	0	0	0	0	0	0	
	78	0	0	0	0	0	0	0	
EP	13	10	8	5	11	21	13	6	4/6
	17	0	0	0	0	0	0	0	
	38	5	0	5	29	10	23	5	
	39	10	0	0	24	11	24	4	
	67	0	0	25	10	0	0	2	
	68	0	0	0	24	13	30	3	
EP+NP	7	39	11	15	16	0	34	5	5/7
	37	19	0	51	11	12	43	5	
	46	0	0	0	0	0	7	1	
	47	0	0	13	0	0	10	2	
	59	10	0	12	10	0	30	4	
	72	36	11	41	61	55	71	6	
	76	37	32	24	37	19	12	6	
ID+NP	10	0	0	0	0	0	0	0	1/6
	36	0	0	0	0	0	0	0	
	45	0	0	23	0	33	34	3	
	71	0	35	0	27	0	0	2	
	75	0	0	0	0	0	0	0	
	77	0	19	14	0	0	0	2	
DMN	2	0	0	7	7	0	6	3	2/7
	12	0	0	7	7	0	15	3	
	16	0	0	0	0	0	0	0	
	25	0	0	0	0	0	30	1	
	35	0	0	0	15	0	0	1	
	53	0	0	30	0	0	0	1	
	58	0	0	0	0	0	0	0	
DMN/EP	11	0	0	0	24	0	0	1	1/7
	14	0	0	0	0	18	27	2	
	23	0	0	43	0	0	55	2	
	54	0	0	0	0	0	0	0	
	56	0	0	9	17	12	17	4	
	65	0	0	26	0	0	0	1	
	74	0	0	0	0	0	0	0	

Discussion

DNA delivery with DMN is an emerging technology with advantages such as elimination of needles and hazardous waste, improved vaccine thermostability, potential dose-sparing capacity and self-administration. However to date, it is unknown if the potency of a DNA vaccine can be enhanced by DMN delivery into the skin in a relevant preclinical model such as pigs. In this work, we evaluated DNA delivery by DMN compared to EP in the pig via skin and we found that, although plasmid DNA was expressed in skin upon DMN application, very weak IFN γ T cell response and no B cell responses were induced to the PRRSV antigens. Conversely, EP, especially when combined to cationic PLGA NPs, induced both IgG and IFN γ -T cell responses. We also found that DMN with DNA combined or not on cationic PLGA NPs, did not induce detectable innate response whereas EP did induce substantial innate inflammatory responses. This finding suggests avenues for improving the immunogenicity of DMN by addition of innate immunity stimulants in pigs and likely in humans.

The pig is considered as the preclinical model of choice by the scientific community and health authorities to evaluate the efficacy and toxicity of drug delivery through skin as well as to study wound healing mechanisms (Ganderup et al. 2012). Anatomical, physiological and immunological properties of pig skin also support the pertinence of this animal model for assessing needle-free vaccine delivery (Andrianov et al. 2009). Indeed, pig and human skins share the same general structure, thickness, hair follicle content, pigmentation, collagen and lipid composition, by opposition with rodents (Summerfield, Meurens, and Ricklin 2015). In addition, the immune and inflammatory responses of human and pigs are closer to each other than to the rodent ones (Mair et al. 2014). Indeed, the immune and inflammation-related gene families expanded or contracted with similar rates during human and pig evolution but with much higher rates in rodents, and the structural functional protein-domain of orthologous immune and inflammation-related genes show a higher degree of preservation between human and pig than between these species and rodents (Dawson, Smith, et al. 2017) (Dawson, Chen, et al. 2017). This convergent genetic evolution might be related to shared selection pressures by the same families of pathogens such as intestinal worms and by zoonotic agents such as influenza, rotavirus, Campylobacter, Toxoplasma gondii etc (Groenen et al. 2012). Correlatively pig and human macrophages present similar genomic responses during M1 polarization upon LPS stimulation, whereas mouse macrophages genomic response appears more distant (Dawson, Smith, et al. 2017; Kapetanovic et al. 2012; Fairbairn et al. 2011). Our

group also showed that pig and human skin display similar subsets of dendritic cells and macrophages in the epidermis and dermis, based on comparative transcriptomes and functional analyses (Marquet et al. 2014). Therefore, pig presents skin tissue and immune characteristics more relevant than the rodent ones for prediction of efficacy of needle-free delivery of vaccines such as DNA vaccines with DMN in human.

Significant transduction of skin cells in pigs was obtained with DMN as previously published in mice (Qiu et al. 2016; Cole et al. 2018). However, at the difference with other studies using solid MN in mice (Prow et al. 2010; Kumar et al. 2012), we did not measure a benefit of DNA combination to cationic PLGA NPs in terms of transgene expression. This may highlight difference in potency of DNA vaccines in mice compared to larger animals. This difference may also be due to using net negatively charged DNA-conjugated particles, whereas net positively charged plasmid DNA-cationic NP complexes were shown to be the most favorable to immunogenicity (Kumar et al. 2012). In addition, only about 15 % of DNA is adsorbed on cationic PLGA, therefore most of the DNA is naked in our DMN. The DNA load on DMN is 44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ patch, therefore a skin biopsy (0.5 cm^2) corresponds to a theoretical delivery of 22 μg DNA whereas in the case of EP, the biopsy roughly corresponds to the whole delivery of 100 μg DNA. Therefore, it is possible that the efficiency of gene transfer by DMN per μg DNA is pretty high, although escalating doses should be used with both delivery methods in order to make a conclusive statement. It is also possible that the transfected cell types in skin are different between the different methods. In the case of surface EP, the dominant transduced cell types vary between studies, and were identified as keratinocytes, fibrocytes, dendritic-like cells, adipocytes or myocytes, possibly due to differences in the investigated species and in the precise site of injection in the dermis (Todorova et al. 2017; Smith et al. 2014; Amante et al. 2015). The transduced cells have not yet been identified in the case of DMN, to the best of our knowledge. Cell localization studies involving refined imaging technologies such as cleared in-toto tissue and confocal microscopy with suitable reagents will be needed to reliably assess the in vivo transfected cell type and their location in the skin or elsewhere (McCaffrey et al. 2016). It is also possible that DNA combination with PLGA NPs alters the cell type that capture the DNA, and favors cells endowed with higher endocytic capacities, especially after (outside) the EP pulses.

Efficient immunogenicity of DNA vaccination has been previously related to inflammatory cell mobilization induced by the delivery method (Babiuk et al. 2004; Todorova et al. 2017). In monkey, surface EP was shown to induce the accumulation of monocyte/macrophage cells

and granulocytes, as well as the accumulation of cells identified as cDC in the dermis, and also the mobilization of LC from the epidermis (Todorova et al. 2017). In our pig experiment, we confirm the strong accumulation of monocyte/macrophage cells and granulocytes upon surface EP but we detected a decrease by about 50% in the representation of cDC and LC among skin cells, whereas the total cell number did not significantly vary with DMN patches (Fig. 3A). It is therefore probable that, following EP, skin cDC and LC enhance their migration rate to the lymph node in pigs, and that combination with NPs further increase the cDC migration, possibly in link with the improved T and B cell responses. It is possible that the DC mobilization signaling and kinetics vary between pigs and monkeys.

Together with the inflammatory cell mobilization, we found that EP, with and without PLGA NPs, induced the synthesis of IL-8 and IL-1 β . IL-8 is involved in immune cell recruitment and IL-1 β is recognized as an important immune adjuvant molecule, which is released in response to cellular stress and damage associated molecular patterns and which effectively activates antigen presenting cells and adaptive immunity (Munoz-Wolf and Lavelle 2018). DMN, with and without NP, did not induce detectable inflammatory cell mobilization nor inflammatory cytokine secretion. We also previously demonstrated significantly reduced cytokine induction when vaccines were administered to mice using silicon MN arrays compared to ID delivery (Carey et al. 2011; Carey et al. 2014). Although only a limited number of cytokines - 12- were evaluated in the current study, the findings support the hypothesis that MN delivery does not cause the same innate activation as the “traumatic” electroporation (Schultheis et al. 2018). However, in comparison to our previous studies in mice with virus vectored vaccines (Carey et al. 2011; Carey et al. 2014), much lower vaccine immunogenicity was observed in this study in pigs post DNA administration with DMN. Therefore, inclusion of an inflammatory adjuvant would be beneficial to DMN immunogenicity, such as shown in pigs in the case of the skin administration of protein hepatitis B surface antigen coated onto MN (Andrianov et al. 2009). Alternatively, non-ablative fractional laser treatment (Wang, Li, and Wu 2015) may also enhance DMN-DNA immunogenicity. TLR4 and 9 ligands were previously shown in mice to synergize with DNA vaccination (Saade and Petrovsky 2012). Finally a TLR7 ligand, which induces a strong skin inflammation (Schon and Schon 2007), may be particularly suitable in the case of DNA loaded DMN.

pPRRSV-AG vaccine combined to cationic PLGA NPs and loaded on DMN induced very weak IFN γ -T cell responses and no B cell responses. Interestingly we found that pPRRSV-

AG vaccine delivered with EP induced IFN γ -T cell responses, especially when the DNA was combined to cationic PLGA NP, a regimen which increased the magnitude of the response and the breadth of the response to the different antigens. We did not observe an effect of cationic PLGA NPs on skin cell transduction nor cytokine production at 24 hours, but some effect on cDC representation. The positive effect of cationic PLGA NPs versus plain EP on the IFN γ -T cell response may be related to increased cDC mobilization to lymph node, to improved sensing of the DNA within cDC leading to their higher activation, to favoring cDC transduction, to the improved duration of plasmid expression. PRRSV, in its infectious and attenuated forms, is considered as a poorly immunogenic virus, especially regarding the induction of T cell responses; therefore the T cell responses that we obtained with EP combined to cationic PLGA NPs are promising in the perspective of a vaccine development relying on broad T cell responses. The DNA vaccine strategy could also be advantageously used as a priming vaccine with an attenuated PRRSV vaccine boost, in order to optimize the T cell response breadth and develop effective control strategies of this damaging infection in the pig industry.

Altogether surface EP revealed to be superior than DMN patches to deliver DNA and elicit T and B cell responses in pigs, in the conditions that we used. New portable systems using the EP principle suggest that this technology has a practical clinical future both in human and possibly in veterinary medicine (Amante et al. 2015). Importantly, the in vivo transgene expression induced by DNA delivered with DMN suggests that this technology also holds promises and, based on our finding, should be optimized with inflammation triggers of suitable quality for eliciting the desired adaptive immune response in the pig and likely in human. Further research is needed to identify the type of adjuvant that best promotes DNA vaccination efficacy.

Acknowledgements

We are grateful to Frédéric Martinon (CEA, Fontenay, France) for his guidance and lending of the CUY 21 Edit System apparatus. We thank François Lefèvre (INRA, Jouy-en-Josas, France) for the pGM-CSF plasmid and Stéphane Biacchesi (INRA, Jouy-en-Josas, France) for the pLuc plasmid. We thank the DIM-ASTREA and the Department of Animal Health at INRA for the financial support allowing the purchase of the ispot/fluorospot. We thank Conor O'Mahony for the microneedle moulds (Tyndall National Institute, Cork). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Programme for research, technological development and demonstration under the Grant Agreement n°633184. This publication reflects the views only of the author, and not the European Commission (EC). The EC is not liable for any use that may be made of the information contained herein.

References

- Amante, D. H., T. R. Smith, J. M. Mendoza, K. Schultheis, J. R. McCoy, A. S. Khan, N. Y. Sardesai and K. E. Broderick (2015). "Skin Transfection Patterns and Expression Kinetics of Electroporation-Enhanced Plasmid Delivery Using the CELLECTRA-3P, a Portable Next-Generation Dermal Electroporation Device." Hum Gene Ther Methods 26(4): 134-146.
- Andrianov, A. K., D. P. DeCollibus, H. A. Gillis, H. H. Kha, A. Marin, M. R. Prausnitz, L. A. Babiuk, H. Townsend and G. Mutwiri (2009). "Poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene] is a potent adjuvant for intradermal immunization." Proc Natl Acad Sci U S A 106(45): 18936-18941.
- Arya, J. M., K. Dewitt, M. Scott-Garrard, Y. W. Chiang and M. R. Prausnitz (2016). "Rabies vaccination in dogs using a dissolving microneedle patch." J Control Release 239: 19-26.
- Auray, G., I. Keller, S. Python, M. Gerber, R. Bruggmann, N. Ruggli and A. Summerfield (2016). "Characterization and Transcriptomic Analysis of Porcine Blood Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells Reveals Striking Species-Specific Differences." J Immunol 197(12): 4791-4806.
- Babiuk, S., M. E. Baca-Estrada, M. Foldvari, D. M. Middleton, D. Rabussay, G. Widera and L. A. Babiuk (2004). "Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines." J Biotechnol 110(1): 1-10.
- Barbon, C. M., L. Baker, C. Lajoie, U. Ramstedt, M. L. Hedley and T. M. Luby (2010). "In vivo electroporation enhances the potency of poly-lactide co-glycolide (PLG) plasmid DNA immunization." Vaccine 28(50): 7852-7864.
- Bernelin-Cottet, C., C. Deloizy, O. Stanek, C. Barc, E. Bouguyon, C. Urien, O. Boulesteix, J. Pezant, C. A. Richard, M. Moudjou, B. Da Costa, L. Jouneau, C. Chevalier, C. Leclerc, P. Sebo, N. Bertho and I. Schwartz-Cornil (2016). "A Universal Influenza Vaccine Can Lead to Disease Exacerbation or Viral Control Depending on Delivery Strategies." Front Immunol 7: 641.
- Calvet, C. Y., F. M. Andre and L. M. Mir (2014). "Dual therapeutic benefit of electroporation-mediated DNA vaccination in vivo: Enhanced gene transfer and adjuvant activity." Oncoimmunology 3: e28540.
- Carey, J. B., F. E. Pearson, A. Vrdoljak, M. G. McGrath, A. M. Crean, P. T. Walsh, T. Doody, C. O'Mahony, A. V. Hill and A. C. Moore (2011). "Microneedle array design determines the induction of protective memory CD8+ T cell responses induced by a recombinant live malaria vaccine in mice." PLoS One 6(7): e22442.
- Carey, J. B., A. Vrdoljak, C. O'Mahony, A. V. Hill, S. J. Draper and A. C. Moore (2014). "Microneedle-mediated immunization of an adenovirus-based malaria vaccine enhances antigen-specific antibody immunity and reduces anti-vector responses compared to the intradermal route." Sci Rep 4: 6154.
- Chrun, T., S. Lacote, C. Urien, L. Jouneau, C. Barc, E. Bouguyon, V. Contreras, A. Ferrier-Rembert, C. N. Peyrefitte, N. Busquets, E. Vidal, J. Pujols, P. Marianneau and I. Schwartz-Cornil (2018). "A Rift Valley fever virus Gn ectodomain-based DNA vaccine induces a partial protection not improved by APC targeting." NPJ Vaccines 3: 14.
- Cole, G., A. A. Ali, C. M. McCrudden, J. W. McBride, J. McCaffrey, T. Robson, V. L. Kett, N.

- J. Dunne, R. F. Donnelly and H. O. McCarthy (2018). "DNA vaccination for cervical cancer: Strategic optimisation of RALA mediated gene delivery from a biodegradable microneedle system." Eur J Pharm Biopharm 127: 288-297.
- Delmas, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L. K. Vogel, H. Sjoström, O. Noren and H. Laude (1992). "Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV." Nature 357(6377): 417-420.
- Dul, M., M. Stefanidou, P. Porta, J. Serve, C. O'Mahony, B. Malissen, S. Henri, Y. Levin, E. Kochba, F. S. Wong, C. Dayan, S. A. Coulman and J. C. Birchall (2017). "Hydrodynamic gene delivery in human skin using a hollow microneedle device." J Control Release 265: 120-131.
- Ghosh, M., B. McAuliffe, J. Subramani, S. Basu and L. H. Shapiro (2012). "CD13 regulates dendritic cell cross-presentation and T cell responses by inhibiting receptor-mediated antigen uptake." J Immunol 188(11): 5489-5499.
- Gill, H. S., J. Soderholm, M. R. Prausnitz and M. Sallberg (2010). "Cutaneous vaccination using microneedles coated with hepatitis C DNA vaccine." Gene Ther 17(6): 811-814.
- Gothelf, A. and J. Gehl (2012). "What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines." Human vaccines & immunotherapeutics 8(11): 1694-1702.
- Granot, T., T. Senda, D. J. Carpenter, N. Matsuoka, J. Weiner, C. L. Gordon, M. Miron, B. V. Kumar, A. Griesemer, S. H. Ho, H. Lerner, J. J. Thome, T. Connors, B. Reizis and D. L. Farber (2017). "Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life." Immunity 46(3): 504-515.
- Kumar, A., P. Wonganan, M. A. Sandoval, X. Li, S. Zhu and Z. Cui (2012). "Microneedle-mediated transcutaneous immunization with plasmid DNA coated on cationic PLGA nanoparticles." J Control Release 163(2): 230-239.
- Lunney, J. K., Y. Fang, A. Ladinig, N. Chen, Y. Li, B. Rowland and G. J. Renukaradhya (2016). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System." Annu Rev Anim Biosci 4: 129-154.
- Ma, Y., W. Tao, S. J. Krebs, W. F. Sutton, N. L. Haigwood and H. S. Gill (2014). "Vaccine delivery to the oral cavity using coated microneedles induces systemic and mucosal immunity." Pharm Res 31(9): 2393-2403.
- Maisonasse, P., E. Bouguyon, G. Piton, A. Ezquerro, C. Urien, C. Deloizy, M. Bourge, J. J. Leplat, G. Simon, C. Chevalier, S. Vincent-Nulleau, E. Crisci, M. Montoya, I. Schwartz-Cornil and N. Bertho (2016). "The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model." Mucosal Immunol 9: 835-849.
- Marquet, F., M. Bonneau, F. Pascale, C. Urien, C. Kang, I. Schwartz-Cornil and N. Bertho (2011). "Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the Swine model." PLoS One 6(1): e16320.
- Marquet, F., T. P. Vu Manh, P. Maisonasse, J. Elhmouzi-Younes, C. Urien, E. Bouguyon, L. Jouneau, M. Bourge, G. Simon, A. Ezquerro, J. Lecardonnell, M. Bonneau, M. Dalod, I. Schwartz-Cornil and N. Bertho (2014). "Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities." J Immunol 193(12): 5883-5893.
- Marshall, S., L. J. Sahn and A. C. Moore (2016). "The success of microneedle-mediated vaccine delivery into skin." Hum Vaccin Immunother 12(11): 2975-2983.
- McCaffrey, J., C. M. McCrudden, A. A. Ali, A. S. Massey, J. W. McBride, M. T. McCrudden, E. M. Vicente-Perez, J. A. Coulter, T. Robson, R. F. Donnelly and H. O. McCarthy (2016). "Transcending epithelial and intracellular biological barriers; a prototype DNA delivery device." J Control Release 226: 238-247.
- McGrath, M. G., S. Vucen, A. Vrdoljak, A. Kelly, C. O'Mahony, A. M. Crean and A. Moore (2014). "Production of dissolvable microneedles using an atomised spray process: effect of microneedle composition on skin penetration." Eur J Pharm Biopharm 86(2): 200-211.
- Mikszta, J. A., J. B. Alarcon, J. M. Brittingham, D. E. Sutter, R. J. Pettis and N. G. Harvey (2002). "Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery." Nat Med 8(4): 415-419.
- Mokhtar, H., M. Eck, S. B. Morgan, S. E. Essler, J. P. Frossard, N. Ruggli and S. P. Graham (2014). "Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity." Vaccine 32(50): 6828-6837.
- Munoz-Wolf, N. and E. C. Lavelle (2018). "A Guide to IL-1 family cytokines in adjuvanticity." FEBS J.
- Prow, T. W., X. Chen, N. A. Prow, G. J. Fernando, C. S. Tan, A. P. Raphael, D. Chang, M. P. Ruutu, D. W. Jenkins, A. Pyke, M. L. Crichton, K. Raphaelli, L. Y. Goh, I. H. Frazer, M. S. Roberts, J. Gardner, A. A. Khromykh, A. Suhrbier, R. A. Hall and M. A. Kendall (2010). "Nanopatch-targeted skin vaccination against West Nile Virus and Chikungunya virus in mice." Small 6(16): 1776-1784.
- Qiu, Y., L. Guo, S. Zhang, B. Xu, Y. Gao, Y. Hu, J. Hou, B. Bai, H. Shen and P. Mao (2016). "DNA-based vaccination against hepatitis B virus using dissolving microneedle arrays adjuvanted by

cationic liposomes and CpG ODN." Drug Deliv 23(7): 2391-2398.

Saade, F. and N. Petrovsky (2012). "Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines." Expert Rev Vaccines 11(2): 189-209.

Schon, M. P. and M. Schon (2007). "Imiquimod: mode of action." Br J Dermatol 157 Suppl 2: 8-13.

Schultheis, K., T. R. F. Smith, W. B. Kiosses, K. A. Kraynyak, A. Wong, J. Oh and K. E. Broderick (2018). "Delineating the cell death mechanisms associated with skin electroporation." Hum Gene Ther Methods.

Simon, G. A. and H. I. Maibach (2000). "The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 13(5): 229-234.

Smith, T. R., K. Schultheis, W. B. Kiosses, D. H. Amante, J. M. Mendoza, J. C. Stone, J. R. McCoy, N. Y. Sardesai and K. E. Broderick (2014). "DNA vaccination strategy targets epidermal dendritic cells, initiating their migration and induction of a host immune response." Mol Ther Methods Clin Dev 1: 14054.

Somasundaram, C., H. Takamatsu, C. Andreoni, J. C. Audonnet, L. Fischer, F. Lefevre and B. Charley (1999). "Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus." Vet Immunol Immunopathol 70(3-4): 277-287.

Subramaniam, S., P. Pineyro, R. J. Derscheid, D. M. Madson, D. R. Magstadt and X. J. Meng (2017). "Dendritic cell-targeted porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens adjuvanted with polyinosinic-polycytidylic acid

(poly (I:C)) induced non-protective immune responses against heterologous type 2 PRRSV challenge in pigs." Vet Immunol Immunopathol 190: 18-25.

Subramaniam, S., P. Pineyro, D. Tian, C. Overend, D. M. Yugo, S. R. Matzinger, A. J. Rogers, M. E. Haac, Q. Cao, C. L. Heffron, N. Catanzaro, S. P. Kenney, Y. W. Huang, T. Opriessnig and X. J. Meng (2014). "In vivo targeting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen through porcine DC-SIGN to dendritic cells elicits antigen-specific CD4T cell immunity in pigs." Vaccine 32(50): 6768-6775.

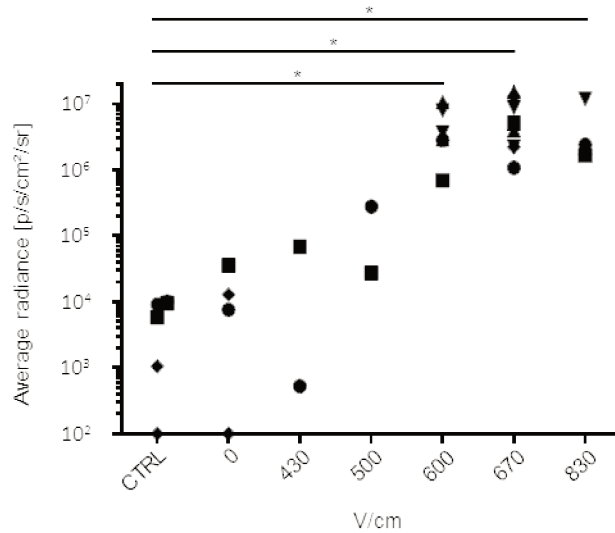
Todorova, B., L. Adam, S. Culina, R. Boisgard, F. Martinon, A. Cosma, M. Ustav, T. Kortulewski, R. Le Grand and C. Chapon (2017). "Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques." Sci Rep 7(1): 4122.

Tregoning, J. S. and E. Kinnear (2014). "Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases." Microbiol Spectr 2(6).

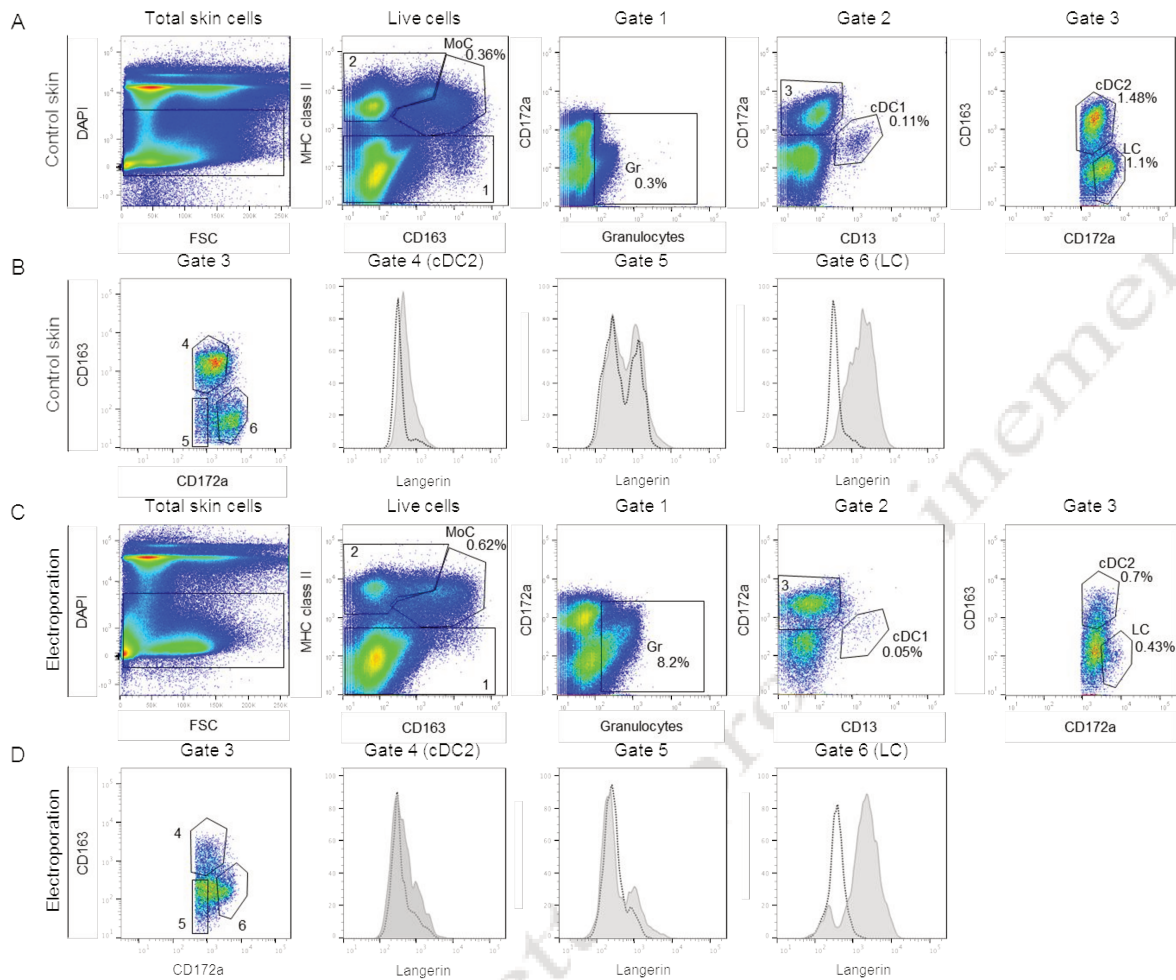
Vrdoljak, A., E. A. Allen, F. Ferrara, N. J. Temperton, A. M. Crean and A. C. Moore (2016). "Induction of broad immunity by thermostabilised vaccines incorporated in dissolvable microneedles using novel fabrication methods." J Control Release 225: 192-204.

Wang, J., B. Li and M. X. Wu (2015). "Effective and lesion-free cutaneous influenza vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A 112(16): 5005-5010.

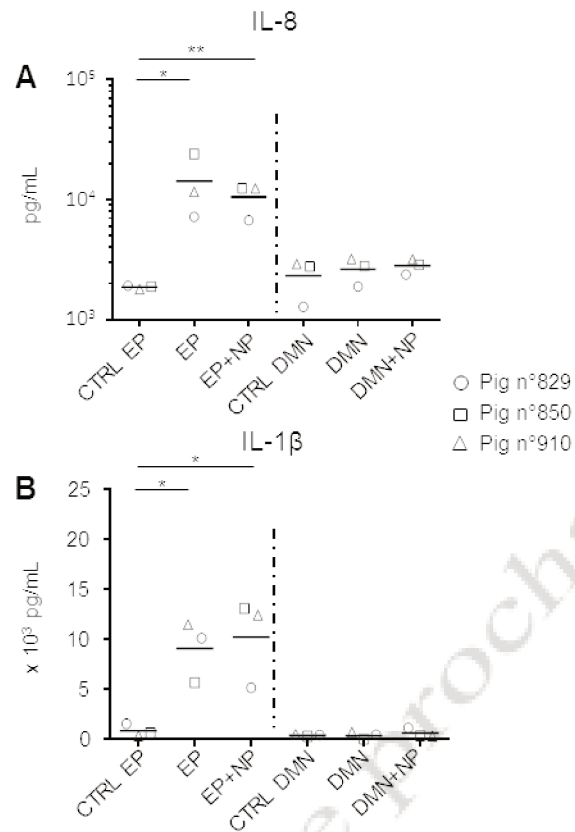
Yan, G., N. Arelly, N. Farhan, S. Lobo and H. Li (2014). "Enhancing DNA delivery into the skin with a motorized microneedle device." Eur J Pharm Sci 52: 215-222.



Supplementary figure 1. Optimization of the surface EP V/cm parameter for pLuc expression in pig skin in vivo. pLuc (100 µg) was injected intradermally in pig skin followed by surface EP (6 pulses, 10 ms per pulse with 90 ms intervals). Different voltages per cm pulses were applied. After 48 hours, the site of surface EP was harvested and processed to measure the luciferase activity (p/s/cm²/sr). Skin control was harvested. The luciferase activity of the skin biopsies treated at different V/cm from a given pig is represented by the same symbol and 5 pigs have been used in total (2308 ●, 2327 ■, 2254 ▲, 2307 ▼, 73 ◆). The luciferase activity mean obtained at a given V/cm from different pig is shown as a horizontal bar. Significant differences between the injected sites and control sites were determined with the non-parametric Mann-Whitney test (*, p < 0.05).



Supplementary figure 2. Myeloid cell subset identification in pig skin. Cells were collected from an overnight enzymatic digestion of skin biopsies, which had been harvested 24 hours after pLuc+pGM-CSF injection followed by EP and from the control zone. In **A** (control skin), DAPI^{neg} live cells were gated according to their labeling with anti-MHC class II (MSA3 mAb) and anti-CD163 (clone 2A10/11), based on our previous published works (Marquet et al. 2011, Marquet, 2014 #1732). MHC class II^{neg} define Gate 1 which was used to identify granulocytes (Gr). MHC class II^{pos} and CD163^{int/neg} cells define a cDC/LC gate 2 and are further split into CD172a^{pos} (Gate 3) and CD13^{pos} cDC1 cells (Auray et al. 2016). Gate 3 allows to identify CD163^{int} cells as cDC2 (Marquet et al. 2011, Marquet, 2014 #1732) and CD163^{neg} CD172a^{high} cells as LC. The rest of the MHC class II^{pos} and CD163^{int/pos} cells outside of the cDC/LC gate corresponds to monocyte/macrophage cells (MoC) which express variable and continuous level of CD163, from intermediate to high. In **B**, control skin cells were analysed similarly as in **A** except that the anti-CD13 was not used and that the labeled cells were fixed and permeabilised for langerin detection (see material and methods). In gate 3 (CD172a^{pos} cells as in **A**), gate 4 (cDC2), gate 5 (CD172a^{low}) and gate 6 (CD172a^{high}, LC) cells were analysed for langerin expression against a rat IgG2a biotinylated control. In **C** and **D**, an example of the same staining as in **A** and **B** of skin cells obtained following EP, is provided.



Supplementary figure 3. Inflammatory cytokine secretion upon administration of pLuc delivered in skin using surface EP and DMN patch application. Plasmids were administered as described in Fig. 3 except that only pLuc was used. Twenty-four hours after, skin biopsies were aseptically collected, washed in PBS and placed in RPMI + 10% FCS + 1 % antibiotic/antimycotic cocktail for 24h. Cytokines were detected using a multiplex cytometric bead assay and the cytokine concentration was evaluated using a standard curve with recombinant cytokines. Significant differences between the injected sites and control sites were determined with a unilateral paired t-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Article n°3 : « Une stratégie de prime-boost à vaccin à ADN - vaccin atténué (MLV) étend la réponse lymphocytaire T et augmente la réponse humorale contre le PRRSV »

Journal ciblé : Viruses | impact factor in 2017 : 3,761

L'**article 2** a montré qu'il était possible d'induire des réponses lymphocytaires T contre des antigènes du PRRSV-1 présentant des épitopes conservés inter-souches, dans le but de développer un « T cell vaccine », efficace en protection hétérologue. La réponse lymphocytaire T IFN γ la plus élevée et étendue a été obtenue avec la stratégie de vaccin à ADN adsorbé à des nanoparticules cationiques (PLGA NP) injecté dans la peau par la voie intradermique suivi d'une électroporation en surface (EP). L'objectif de l'**article 3** est d'évaluer le bénéfice immunologique d'un ciblage des antigènes aux APC dans une stratégie de vaccin à ADN strict ou de prime-boost ADN-MLV. Le bénéfice recherché concerne le niveau et l'étendue antigénique des réponses lymphocytaire T en priorité, mais nous avons également analysé l'effet de nos stratégies sur la réponse anticorps. Nous avons cherché à produire des vecteurs pour l'expression des antigènes sous forme « native » (**article 2**) et dans des structures de vaccibodies (VB) dimériques comprenant un domaine antigène et un domaine ciblant les APC. Les antigènes choisis sont dénués de leur domaine transmembranaire pour permettre la sécrétion par les cellules transfectées. Nous avons évalué l'efficacité de l'« APC-targeting » en ciblant deux récepteurs : XCR1 et CD11c. Le ciblage de XCR1 et CD11c est connu chez la souris pour induire des réponses Th1 et CD8^{pos}. XCR1 est un récepteur exclusivement exprimé par les cDC1 chez le porc. CD11c est un récepteur exprimé par les cellules myéloïdes porcines. Le ciblage de CD11c a été réalisé avec les domaines variables de l'anticorps utilisé dans l'**article 1**.

Vaccibody, notre partenaire du projet SAPHIR, n'a pas réussi à faire sécréter et/ou exprimer nsp1 β entière ou RdRp dans les VB (Vaccibody, Norvège). Vaccibody a produit des VB ciblés vers XCR1 pour nsp1 β clivée en 2 parties: NSP1 β _{1-202aa}, -NSP1 β _{182-383aa}. Nous avons montré que les VB-XCL1-N, -GP4GP5M, -NSP1 β _{1-202aa}, -NSP1 β _{182-383aa} et que les VB-scCD11c-N, -GP4GP5M étaient sécrétés dans les surnageants de cellules 293T transfectées. Nous avons également montré que les VB-XCL1 sécrétés interagissent avec les cDC1 porcines et que les VB-scCD11c exprimés et sécrétés interagissent avec les cellules myéloïdes porcines. Nous avons immunisé des porcs âgés d'un mois répartis en deux grands groupes, soit en injectant trois fois les plasmides avec un mois d'intervalle entre chaque injection (groupes ADN3X), soit un prime ADN et un boost MLV un mois plus tard (groupes ADN-MLV) en intramusculaire. En effet, nous avons fait l'hypothèse que ce prime-boost pourrait renforcer et étendre les réponses lymphocytaires T induite par le MLV pour augmenter sa capacité cross-protectrice. Dans les groupes ADN3X et ADN-MLV, nous avons comparé l'immunogénicité des vaccins à ADN ciblant XCR1 (groupes XCL1), CD11c (groupes

scCD11c) ou la forme native des antigènes (groupes UT pour untargeted). Nous avons deux groupes de référence : un n'est pas immunisé (Ctrl) et un ne reçoit que le MLV (MLV-only). Treize jours après la troisième injection pour ADN3X ou après le boost MLV, nous avons stimulé les PBMC des porcs avec les peptides chevauchants de 20 mers utilisés dans l'Article 2. La réponse IFN γ est plus forte et surtout plus étendue (i.e. dirigée contre un plus grand nombre d'antigènes) chez les porcs ADN-MLV que chez les porcs ADN3X et MLV-only. Par contre, aucun bénéfice du ciblage de XCR1 ou de CD11c n'a été observé. La stratégie ADN-MLV ciblée ou non, a induit une réponse humorale IgG anti-N plus rapide et plus élevée que la stratégie ADN3X ou MLV-only. De manière notable dans la stratégie ADN-MLV, nous avons observé un bénéfice très significatif du ciblage de CD11c et surtout de XCR1 sur la réponse IgG anti-N. Enfin, nous avons pu observer une diminution de la charge virale MLV dans les sérums des porcs primo-injectés avec les VB-XCL1, suggérant que le prime-boost ADN-MLV pourrait améliorer la sureté des MLV.

Ainsi la stratégie ADN-MLV est la plus efficace des stratégies testées ici pour induire des réponses lymphocytaires T IFN γ . Nous avons observé un bénéfice du ciblage de XCR1 ou de CD11c pour induire de meilleures réponses humorales, mais pas pour induire des réponses lymphocytaires T IFN γ . Ainsi dans la suite du travail, nous avons sélectionné la stratégie ADN-MLV, dont nous avons cherché à améliorer le mode d'administration en complément de l'article 2 pour rendre adaptable sur le terrain, avant de la tester face à une épreuve infectieuse.

Les formulations PLGA NP ont été produites par un partenaire suisse (équipe de Nicolas Collin et Christophe Barnier-Quer, Université de Lausanne). Dans ce travail, j'ai participé à l'immunisation des porcs qui ont eu lieu dans la Plate-Forme d'Infection Expérimentale (PFIE) de Nouzilly et à la collecte des prélèvements. Les ELISA et les productions de plasmides ont été partagées avec Céline Urien et l'analyse des interactions entre les VB et les cellules porcines en cytométrie avec Isabelle Schwartz. J'ai pris en charge totalement l'analyse des réponses lymphocytaires IFN γ . L'analyse des charges virales a été faite par Céline Urien.

J'ai contribué à la mise en forme des résultats de l'article.

A DNA-modified live vaccine prime-boost strategy broadens the T cell response and enhances the antibody response against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Cindy Bernelin-Cottet^a, Céline Urien^a, Fany Blanc^b, Virginie Jakob^c, Elise Bordet^a, Céline Barc^d, Olivier Boulesteix^d, Vanessa Contreras^e, Christophe Barnier^c, Nicolas Collin^c, Elisabeth Studsrub^f, Agnete-Brunsvik Fredriksen^f, Ivan Trus^g, Hans Nauwynck^g, Nicolas Bertho^a and Isabelle Schwartz-Cornil^a.

^aVIM-INRA-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

^bGABI-INRA-AgroParisTech-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

^cVaccine Formulation Laboratory, University of Lausanne, Chemin des Boveresses 155, 1066 Epalinges, Switzerland

^dINRA, UE1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, PFIE, 37380 Nouzilly, France

^eCEA-Université Paris Sud-INSERM, U1184 « Immunology of viral infections and auto immune diseases », IDMIT department, IBFJ, 92260 Fontenay-aux-Roses & 94270 Kremlin-Bicêtre, France

^fVaccibody AS, GAUSTADALLEEN 21, OSLO 0349, Norway

^gLaboratory of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

Corresponding author: Isabelle Schwartz-Cornil, isabelle.schwartz@inra.fr

Running title: A DNA-MLV prime-boost strategy to vaccinate against PRRSV

Abbreviations: PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

MLV: Modified Live Vaccine; mAb: monoclonal antibody; NP: nanoparticle; DC: dendritic cell; cDC: conventional dendritic cell; VB: vaccibody; PRRSV-AG: PRRSV antigen; VB-PRRSV-AG: vaccibody with PRRSV antigen; pscCD11c-N: plasmid coding vaccibody with scFv anti-CD11c and N antigen ; pscCD11c-GP4GP5M: plasmid coding vaccibody with scFv anti-CD11c and GP4GP5M antigen; pXCL1-N: plasmid coding vaccibody with pig XCL1 and N antigen; pXCL1-GP4GP5M: plasmid coding vaccibody with pig XCL1 and GP4GP5M antigen; pXCL1-NSP1 β 1: plasmid coding vaccibody with pig XCL1 and NSP1 β 1; pXCL1-NSP1 β 2: plasmid coding vaccibody with pig XCL1 and NSP1 β 2; pN: plasmid coding N antigen; pGP4GP5M: plasmid coding GP4GP5M antigen; pNSP1 β : plasmid coding NSP1 β ; pRdRp: plasmid coding RdRp; DNA 3X: groups receiving 3 DNA injections; DNA+MLV groups: groups receiving one DNA injection and one MLV injection; UT: untargeted.

Abstract

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) induces reproductive disorders in sows and respiratory illnesses in growing piglets and is considered as the main pathogenic agent responsible for economic losses in the porcine industry worldwide. Modified live PRRSV vaccines (MLVs) are the most efficient vaccine types against homologous strains but they present safety concerns and low efficacy against heterologous viral variants. With the goal to induce broad and cross-protective immunity, we generated DNA vaccines encoding B and T antigens derived from a European subtype 1 strain and including T-cell epitope sequences known to be conserved across strains. These antigens were expressed either in a native form or in the form of vaccibodies targeted to the endocytic receptor XCR1 and CD11c expressed by different types of antigen-presenting cells (APCs). When delivered in skin with cationic nanoparticles and surface electroporation, these DNA vaccines induced substantial antibody and T cell responses which were not promoted by targeting antigens to APCs. Interestingly, a DNA-MLV prime-boost strategy strongly enhanced the antibody response and broadened the T cell responses over the one induced by MLV or DNA-only. The anti-nucleoprotein antibody response induced by the DNA-MLV prime-boost was clearly promoted by targeting the antigen to CD11c and XCR1, indicating a benefit of APC-targeting for the B-cell response. In conclusion, a DNA-MLV prime-boost strategy, by enhancing the potency and breadth of MLV vaccines, stands as a promising vaccine strategy to improve the control of PRRSV in infected herds.

Introduction

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), a positive strand RNA virus of the arteriviridae family, induces respiratory illness in neonatal and in recently-weaned piglets as well as abortions in sows and is responsible for major economic losses worldwide [1]. This virus, which primarily infects certain types of macrophages including pulmonary alveolar macrophages, exists in two distinct genotypes, Type 1 and 2 which are the dominating genotypes in Europe and North America respectively [1]. Phylogenetic analyses show that Type 1 includes 4 different subtypes and the ORF2 to 5, which encode for viral glycoproteins, present around 30% substitutions at the amino-acid level across strains [2]. The PRRSV genome undergoes frequent random mutations and intragenic recombinations, generating new variants responsible of pathogenic outbreaks [2]. The most effective commercial vaccines are modified live vaccines (MLVs), attenuated by successive in vitro passages. However, MLVs revealed safety concerns with reversion to pathogenicity and only demonstrated partial protection against heterologous strains. This limited cross-strain protection is responsible for the failure of the current commercial MLV vaccines to control PRRSV infections in endemic zones [3-5].

The protective immune effectors against PRRSV involve neutralizing antibodies, which are mostly directed to variable antigenic determinants of outer membrane proteins [6]. However protective immunity can be obtained in absence of neutralizing antibodies and T cell responses have also been proposed to be protective effectors [7-10]. Indeed, IFN γ is effective as inhibiting PRRSV replication [11], and the IFN γ T cell responses were correlated to viremia and viral clearance [7, 8]. Interestingly, both CD4+ and CD8+ T cells can exert anti-viral effects on infected alveolar macrophages expressing MHC class I and II molecules loaded with viral peptides. These viral peptides can presumably originate from all viral molecules, including internal structural and non-structural proteins which are more conserved than the external ones. Furthermore, the T cell receptor recognition may tolerate viral peptide mutations, provided that the overall electric charge and peptide-MHC complex shape is maintained [12]. Therefore, a so called "T cell vaccine" may stand as an interesting control tool against PRRSV. Finally, by using a PRRSV-1 proteome-wide synthetic peptide library, several T cell antigens present a good degree of conservation across viral genotype 1 strains and pigs infected with distant strains showed a remarkably similar profile of T cell antigen-reactivity [13, 14]. The most frequently recognized and conserved T cell antigen sequences were found in NSP5, NSP1 β , RdRp, M, GP5 [13-15].

DNA vaccines are particularly efficient at stimulating T cell responses [16]. In a recent work, we showed that substantial T cell responses against PRRSV antigens could be induced in pigs by DNA vaccines combined with cationic nanoparticles (NP) and delivered in skin with electroporation (**Bernelin et al, article 2**). Here we aimed at further improving these T cell responses by targeting PRRSV antigens to antigen-presenting cells (APCs). Indeed, a huge body of literature indicates, yet mainly in mouse models, that targeting antigens to the most efficient APC type, i.e. conventional dendritic cells (cDCs), strongly enhances the magnitude and breadth of T cell responses [17, 18, 19: Gornati, 2018 #1729], including in the case of DNA vaccination [20-22]. We expressed the PRRSV antigens (PRRSV-AG) in vaccibody structures (VB) which are dimeric platforms designed to target antigens to cellular receptors [23], being here pig XCR1 and CD11c. Indeed, XCR1 is selectively expressed by the cDC1 type which excels in Th1 and CD8+ T cell activation, as found in mice, human, monkey, sheep and pigs [24-26]. CD11c which is broadly expressed on APC including cDC and macrophages in pigs [27], has successfully been used to induce Th1 and CD8+ T cell responses in mice [28, 29]. In human, its intracellular routing to early endosomes was proposed to favour cross-presentation to CD8+ T cells [30] and we showed its potential to promote IFN γ T cell responses in pigs against the influenza NP protein [31]. Based on this encouraging background, we evaluated the immunogenicity of DNA vaccines encoding PRRSV antigens in native forms or targeted to APC, as stand-alone vaccines or in a prime-boost strategy with a MLV vaccine. We found that the DNA-MLV prime-boost regimen induced higher antibody and broader T cell response as compared to DNA alone or MLV alone, and that APC-targeting to CD11c and XCR1 favoured the antibody response induced by the DNA-MLV prime-boost strategy.

Material and Methods

Antibodies

The anti-pig IFN γ mouse P2G10 mAb (capture) and biotinylated anti-pig IFN γ P2G11 mAb were from MabTech AB (Nacka Strand, Sweden). The anti-pig IgA mouse mAb K61-1B4 was bought from Bio-Rad Antibodies. The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody was purchased from Interchim (Jackson ImmunoResearch) and the HRP-conjugated rat anti-mouse IgG1 from BD-bioscience. The hybridoma producing the murine anti-pig CD11c monoclonal antibody (mAb) has been previously described [27]. The mAbs used in this study are the murine anti-pig MHC class II mAb (clone MSA3, IgG2a, Washington State University Monoclonal Antibody Center (WSU)), the anti-pig CD172a mAb (clone 74-22-15A, IgGb, WSU, USA), murine isotype control mAbs, the murine anti-CH3 domain of human IgG mAb (clone 57H, IgM, Biorad antibodies) and the biotinylated murine anti-CH3 domain of human IgG mAb (biot-anti-CH3, clone HP6017, IgG2a, ThermoFisher Scientific). The conjugated isotype-specific antibodies were bought from ThermoFisher Scientific and are: Alexa 647-conjugated (A647)-goat anti-mouse (GAM) IgG2a, APC-Cy7-conjugated (APC-Cy7)-GAM IgG2b, A488-GAM IgM.

Modified live virus

The PRRSV genotype 1 subtype 13V091 strain [32] was attenuated by 73 in vitro passages in the MARC-145 cell line, clone F4. The attenuated strain was named 13V09b and was unable to infect primary alveolar macrophages, even after in vivo passages.

Constructions of vectors expressing PRRSV-AG

pcDNA3.1 vectors encoding four PRRSV-AG sequences from the Flanders' 13V091 isolate, genotype 1 subtype 1, were synthesized by GeneArt. The PRRSV-AG sequences are i) a GP4GP5M chimera that was derived from [33] and transposed to the 13V091 virus (1008 nt), ii) NSP1 β (1176 nt), iii) RdRp (1962 nt), and iv) N (405 nt). In the case of NSP1 β and RdRp which are naturally synthesized from viral polyprotein precursors (ORF1 and 2), an exogenous kozak sequence was added. Only GP4GP5M is expected to be secreted as it includes the natural leader peptide of GP4. Each antigen sequence was terminated by a 6xHis tag. The plasmids are named pGP4GP5M, pN, pNSP1 β , and pRdRp.

The construction of the VB vaccine format has been previously described [34]. The VB format includes a targeting unit, a dimerization unit made of a human Ig hinge and C(H)3 sequences of human IgG3 and an antigen unit (**Figure 1**). A VB with porcine XCL1 as the targeting unit has been previously published by our group [27] and this same targeting unit

sequence including the natural XCL1 leader sequence was used here. The CD11c targeting unit is a single chain Fragment variable (scFv) derived from the mouse IgG1 hybridoma 3A8 anti-pigCD11c whose sequence was determined by Synogene, USA. The sequence was deposited on Bankit (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, BankIt2157014 scFv, MK033322). The leader sequence used in the CD11c-targeted VB is derived from a mouse Ig (MNFGLRLIFLVLTLKGVQC). The four PRRSV-AG used as antigen units (see above) were checked to be free of membrane retention motives using the Annie prediction tool [35]. All sequences were porcine codon optimised, synthesised by GenScript (USA) and cloned in a pUMVC4a vector (Aldevron). NSP1 β were split in 2 parts, from AA 1 - 202 (NSP1 β 1) and AA 182 - 383 (NSP1 β 2). The generated VB plasmids with successful expression and secretion properties (see the result part) used in this study are named pXCL1-N, pXCL1-GP4GP5M, pXCL1-NSP1 β 1, pXCL1-NSP1 β 2, pscCD11c-N, pscCD11c-GP4GP5M. Plasmid productions for immunization were prepared using Endofree® Plasmid Giga Kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and were stored at -20°C until use.

HEK293 cell transfection

HEK293 cells were transfected with plasmids encoding the vaccine constructs by use of Lipofectamine 2000 following the supplier recommendations (Invitrogen, USA). A negative control with Lipofectamine alone was used. The cells were cultivated in DMEM with 10 % FBS and the supernatants were harvested 3 days after transfection for analysis by ELISA and the cells were cultivated in serum free medium (Pro293E-CDM, Lonza, USA), the supernatants were harvested 3 days after, concentrated about 10 times with Vivaspin2 concentrator (GE Healthcare, UK) for analysis by Western Blot and interaction with low density PBMCs.

Detection of VB by ELISA

Costar 96-well plates were coated with anti-CH3 (clone 57H). After blocking plates with 1% (w/v) BSA in PBS with 0.02% (w/v) Na Azide, VB and lipofectamine-only supernatants were added as 4-fold serial dilutions and incubated overnight at 4 °C. The plates were next washed and incubated with biot-anti-CH3 (clone HP-6017) diluted 1:1000 in PBS with 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) Na Azide for 2 h at 20°C. After washing, alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Sigma) diluted 1:3000 in PBS with 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) Na Azide was added and plates were incubated 1 hour at 20°C. The plates were subsequently washed and developed by adding 1 mg/ml phosphatase substrate (Sigma) dissolved in substrate buffer (9.7% w/v diethanol amine, 10.1% w/v MgCl₂·6H₂O and 0.02 M Tris-HCl, pH 9.5). The piglets' mothers were checked to be PRRSV-seronegative with the commercial ELISA.

(w/v) Na Azide in H₂O). OD at 450 nm was measured using a TECAN microplate reader and the net OD values were calculated by subtracting the OD value of the lipofectamine-only supernatant.

Analysis of VB by Western Blots

Vaccine proteins in 10 times concentrated supernatants were incubated in loading sample buffer with 10% β -mercaptoethanol and subsequently run on a mini-protean TGX pre-cast gels. Following electrophoresis, the proteins were blotted onto a PVDF membrane and were detected by biotinylated anti-human IgG and horseradish-peroxidase-conjugated streptavidin (HRP-streptavidin). The immunoreactive bands were visualized with ECL substrate (SuperSignal™ West Femto, Thermofisher).

Interaction of VB with pig low density peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral mononuclear blood cells were enriched in low density cells using an optiprep gradient as we previously described [36]. The cells (3×10^6 per point) were saturated with 5% pig serum in PBS and incubated with 10 times concentrated VB-containing supernatants for 30 min at 4°C. The bound VB were revealed with anti-CH3 mAb followed by a A488-DAM IgM. We used positive and negative VB controls, i.e. pig XCL1-mCherry and Control (Ctrl)-mCherry that were developed previously [27]. The irrelevant targeting unit of Ctrl-mCherry is a scFv specific for the hapten NIP (4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetic acid). Cells were co-labelled with anti-MHC class II mAb followed by A647-GAM IgG2a and anti-CD172A mAb followed by APC-cy7-GAM IgG2b and the specificity of labelling was assessed with appropriate isotype controls. Dead cells were excluded with DAPI staining. The cells were analysed using a Fortessa cytometer (Becton Dickinson) and the FlowJo software.

Cationic PLGA nanoparticles (NP)

The PLGA RG502H polymer (Sigma), was dissolved in methylene chloride as a 5% (w/v) solution and 1 ml was emulsified in with 0.1 mL of HEPES at 20 mM pH 7.4 at high speed using a probe sonicator. The primary emulsion was then added to 5 ml of distilled water containing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (0.5%, w/v). The resulting PLGA-CTAB nanoparticles were washed once in buffer by centrifugation at 10,000g. After preparation, washing, and collection, DNA was adsorbed onto the nanoparticles. The PLGA nanoparticles were provided lyophilised and resuspended in injectable H₂O 30 min before use. DNA was loaded on cationic PLGA NP at a 1:20 ratio (PLGA NP:DNA), based on our first study (Bernelin et al, article 2)

Immunization of pigs

The animal experiment was authorized by the Val de Loire ethic committee under the number APAF1S#4 13-20 15051418327338 v8, at the PFIE-INRA platform in Nouzilly which operates under the agreement #C371753. Pigs (1-month-old) were split in 8 groups including 8 piglets per group, with equal number of males and females per group, except the MLV-only group which contained 9 pigs. The groups' description and the immunization schedule are shown **Figure 2A** and B. On day 0 (D0), pigs were anesthetized (2% isoflurane) and DNA plasmids (400 µg each in 400 µl saline) formulated on cationic PLGA NP (1:20, PLGA NP:DNA) were injected intradermally in three spots in the inguinal zone followed by surface electroporation on the site of injection using the CUY 21 EDIT system (NEPA Gene, Japan). Six electric pulses at 670 V/cm were applied during 10 ms with 90 ms interval, as optimized before (Bernelin et al, submitted). One group of 8 pigs were kept as non-vaccinated controls. Trolamine 0.6% (Biafine, France) was spread on the transfected zone right after administration. On D29, the DNA 3X groups received the same DNA vaccines as on D0. The MLV-only and DNA+MLV groups were moved to A-BSL2 facility and they received MLV FL13b ($10^{5.5}$ TCID per pig) intramuscularly in 2 mL PBS + $Ca^{2+}Mg^{2+}$. The last injection of DNA was done on D62 in the DNA 3X groups. The pigs of the DNA 3X groups were euthanized by an overdose of sodium pentothal on D103 and the pigs of the DNA+MLV groups were euthanized on D75.

Overlapping peptides.

Overlapping peptides (20 mers, offset 8) covering the NSP1 β , RdRp, N and the GP4GP5M PRRSV antigens were synthesized by Mimotopes (Mimotopes Pty Ltd, Victoria, Australia, <http://www.mimotopes.com>). Upon receipt, the peptides were diluted in H2O:acetonitril (50:50 vol) at a 5 mg/ml concentration and grouped as pools of peptides not exceeding 50 peptides: pool N (15 peptides), pool GP (GP4GP5M chimera), pool NSP1 β 1 and 2 pools RdRp1 (peptide 1 to 40), pool RdRp2 (peptide 41 to 80). A 20-mer peptide from the HIV polymerase was used as control.

ELISPOTS on PBMCs from the DNA 3X and DNA+MLV groups

PBMCs were collected on D42 (all groups) and on D75 (DNA 3X groups) on three 8ml Vacutainer® CPT™ (BD Bioscience) by centrifugation at 1800 g for 35 min at 25 °C. PBMCs were washed with PBS+1.3mM citrate and re-suspended in X-vivo medium (Ozyme) + 50% FCS + 1.3 mM citrate and rested overnight. PBMCs were resuspended in X-VIVO-20 medium supplemented with 2% FCS, 100 U/mL penicillin and 1 µg/mL streptomycin (culture medium) and counted for live cells. IFN γ -secreting T cells were detected using PVDF

membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen®HTS, Millipore) coated with 15 µg/ml anti-porcine IFN γ (capture mAb) in PBS. PBMCs (2×10^5) were plated per well and were stimulated with the different pools of overlapping peptides described above at a 10 µg/mL final concentration for 18 hours, in triplicates. A HIV polymerase-derived peptide and ConA at 25 µg/mL were used as controls. After 18h, the IFN γ -secreting cells were revealed by sequential incubations with 0.5 µg/mL biotinylated anti- IFN γ followed by 0.5 µg/mL alkaline phosphatase conjugated-streptavidin and 1-Step™ BCIP/NBT reagent. The spots were enumerated using the iSPOT reader from Autoimmun Diagnostica GmbH. Positive wells were considered if the mean spot numbers in the stimulated conditions were significantly superior to the spot numbers in the control peptide conditions ($p < 0.05$, paired t-test) and if > 55 spots. The mean number of spots from stimulated minus control peptide wells was calculated.

Collection of serum and nasal fluid and evaluation of their content in anti-N IgG by ELISA.

Sera were collected on D0, 29, D62 and D103 in the DNA 3X groups and on D0, D29, D36, D42, D50 and D75 groups. Nasal swabs were collected from the 2 nostrils in PBS + antiprotease cocktail on D0 and D75 in the DNA+MLV groups. Sera and swab collections were kept at -20°C . The sera and swab extracts were assayed using the Ingezim PRRS 2.0 kit (Ingenasa, Spain) at a 1:40 and 1:2 dilution respectively. S/P ratio were calculated as follows: $[\text{OD sample minus OD negative control}]:[\text{OD positive control minus OD negative control}]$, as recommended by Ingenasa.

Viral detection by specific qRT-PCR

For quantification of viral RNA copies in sera and nasal swab collected on D29, 36, 42 and 50, viral RNA was first extracted from 100 µl serum using NucleoSpin ® RNA Virus kit from Nagel-Macherey. A one-step qRT-PCR was performed using the iTaq™ universal probes One-Step kit (Bio-rad) with specific FL13 primers located in ORF1: forward primer 5'-TGTTTCCCCACAGATGTTTCG - 3', reverse primer 5'- CCAGGATTTTGAGGCTTTTCC -3' and fluorescent probe FAM 5'- CCCCAGTCAGTATC -3' TAMRA. The FL13 RNA standard curve was made with 10-fold dilutions from 10^1 to 10^5 TCID $_{50}$ /mL), each spiked in control pig serum and extracted with the NucleoSpin ® RNA Virus kit. The qRT-PCR was performed with 2 µL of sample elution in 10 µL final mix and the cycling involved the following steps: reverse transcription at 50°C for 10 min, denaturation at 95°C for 1 min, amplification 40 cycles at 95°C for 3 s and 60°C for 30 s. TaqMan run of experimental

samples contained 2 replicates, mock pig serum RNA and H₂O. The reactions were carried out in a CFX Connect™ light cycler (Bio-Rad).

Statistical and correlation analysis.

Data were analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software. The unpaired non-parametric one-way Mann-Whitney test was used to compare the Elispot results across groups and the IgG and IgA in sera and swab extracts.

Results

1. Production and biochemical characterization of vaccibodies (VB) for targeting PRRSV-AG to pig XCR1 and CD11c.

We selected sequences from six PRRSV AG derived from the Flanders' 13V091 isolate (genotype 1, subtype 1) to be expressed by DNA vectors in a native form or in vaccibody platforms in order to target these AG to APC with the goal to induce high and broad T cell responses (**Figure 1A and 1B**). The plasmids encoding the untargeted (UT) PRRSV antigens has been described previously (**Bernelin et al., article 2**, and see Material and Methods). The antigenic sequences have to be devoid of retention membrane motives for secretion as vaccibodies and for targeting APC. NSP1 β and RdRp do not contain predicted retention membrane motives as determined with the Annie prediction tool [35] and contain conserved T cell epitopes across PRRSV genotype 1 viruses [14]. A GP4GP5M fusion was built as a chimera which has been previously used to elicit high CD4+ T cell responses with DC-SIGN targeting, although with PRRSV genotype 2 sequences [33]. M is also a well conserved T cell antigen across strains [13, 14] and is included in the chimera. The N antigen is an immunodominant B cell AG and it can be used to probe for the effects of targeting on antibody responses. VB were constructed with these 6 PRRSV antigen sequences and with pig XCL1 and anti-pig CD11c scFv derived from the 3A8 clone [27] as targeting sequences. These pVB-PRRSV-AG constructs were initially transfected in HEK293 cells. The VB with RdRp could not be detected in cell lysates, they were thus not pursued. As XCL1-NSP1 β were detected in cell lysates but not in the supernatants, NSP1 β was split in 2 parts (NSP1 β 1 from AA1 to 202 and NSP1 β 2 from AA 182 to 383). As show **Figure 2A**, VB were detected with an anti-CH3 ELISA in the supernatants of HEK293 cells transfected with pscCD11c-N, pscCD11c-GP4GP5M, pXCL1-N, pXCL1-GP4GP5M, pXCL1-NSP1 β 1, pXCL1-NSP1 β 2 and they appeared to be expressed at variable levels. These secreted VB were also detected in concentrated supernatants using Western blots (**not shown**).

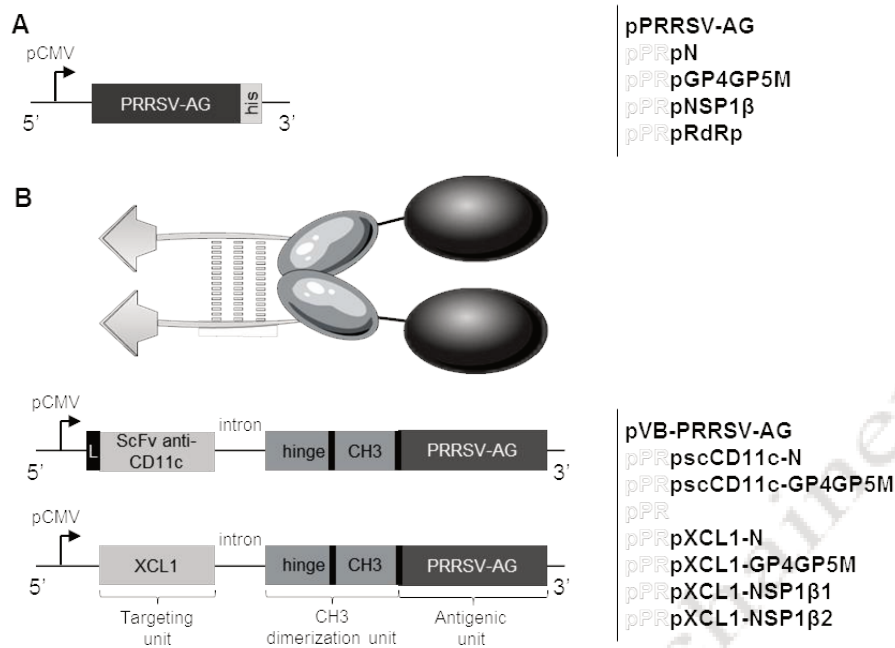


Figure 1. DNA constructs for expression of PRRSV-AG in native forms or in VBs targeting XCR1 and CD11c

A. Four PRRSV AG constructs encompassing six PRRSV AG (13V091 isolate) were codon-optimized, terminated by a 6xHis tag and cloned under the CMV promoter. The 4 constructs are pN, pGP4GP5M chimera, pNSP1β and pRdRp. **B.** The VB-PRRSV-AG include a targeting unit, a dimerization domain derived from the hinge and CH3 domains of human IgG3, and the 4 PRRSV-AG described in A. The VB sequences were also cloned under the CMV promoter. Two constructs, pscCD11c-N and pscCD11c-GP4GP5M, include an anti-pig CD11c scFv sequence for targeting the N and GP4GP5M chimera respectively. Four constructs, pXCL1-N, pXCL1-GP4GP5M, pXCL1-NSP1β 1 and pXCL1-NSP1β 2 target to pig XCR1 the N antigen, the GP4GP5M chimera, the AA 1 - 202 NSP1β fragment and the AA 182 - 383 NSP1β fragment respectively.

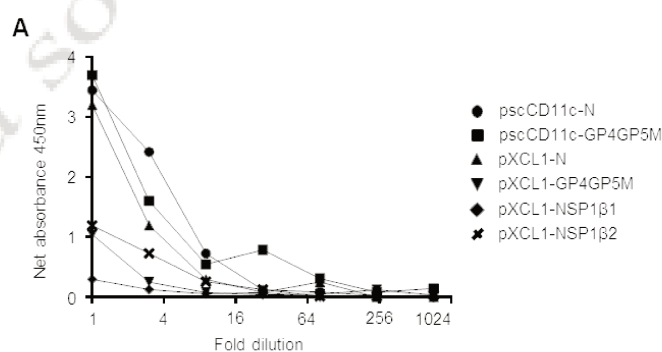


Figure 2. Expression of VB-PRRSV-AG. The pscCD11c-N, pscCD11c-GP4GP5M, pXCL1-N, pXCL1-GP4GP5M, pXCL1-NSP1 β 1 and pXCL1-NSP1 β 2 were transfected in HEK293 cells. **A.** The supernatants were harvested after 3 days and assayed in 4 fold successive dilutions for VB detection in ELISA using anti-CH3 (capture) and biot-anti-CH3 (detection) antibodies (see material and methods). The net absorbance at 450 nm are reported. The supernatants were concentrated 5 x 10 times and loaded on SDS-PAGE, blotted on PVDF membrane and reacted with biot-anti-CH3.

2. Interaction of VB with pig cells.

The concentrated supernatants from HEK293 cells transfected with the pVB-PRRSV-AG plasmids were assayed for their capacity to bind pig myeloid cells and cDC1. Low density pig PBMCs, which were used as a source of enriched pig mononuclear phagocytes, were incubated with the concentrated supernatants and VB were detected with an anti-CH3 mAb. As shown **Figure 3A**, scCD11c-N and scCD11c-GP4GP5M bound pig low density PBMCs [36]. XCL1-N and XCL1-GP4GP5M were detected on MHC class II^{high}, FSChigh, CD172^{low} cells, corresponding to cDC1 [27, 36] (**Figure 3B**). This experiment confirms that VB-PRRSV-AG targeted to CD11c and XCR1 are able to selectively interact with pig myeloid and cDC1 cells respectively.

3. DNA vectors encoding PRRSV-AG in native forms or targeted to pig APC induce IFN γ T cell responses in pigs (DNA 3X groups).

Pigs (1-month-old, 8 per group) were immunized with DNA plasmids encoding VB-PRRSV-AG or UT PRRSV-AG. The plasmids received by the different groups are listed in **Figure 4A** (XCL1, scCD11c, UT groups) and the immunization schedule and the sampling timeline is shown in **Figure 4B**. The plasmids (400 μ g each) were combined to cationic PLGA-NP at a 20:1 DNA:NP ratio and administered intradermally with surface electroporation, as this delivery appeared the most potent to induce T cell response against PRRSV AG in pig in our previous study (**Bernelin et al, article 2**). Three administrations were performed at a month interval (DNA 3X groups). PBMCs were collected 13 days after the third boost and processed to IFN γ ELISPOT analysis using re-stimulating overlapping peptide pools covering the different PRRSV antigenic sequences. The response against RdRp was evaluated with 2 peptide pools (N and C terminal), in order not to exceed 40 peptides per pool and avoid toxicity. **Figure 5** shows that the different plasmid vaccines induced IFN γ responses, with the GP4GP5N peptide pool revealing the lowest responses and the pRdRP pools showing the highest response, which reached statistical significance versus the control group (Mann Whitney test). The number of recognized peptide pools was calculated for each pig. In all immunized groups, ≥ 5 pigs out of 8 responded to at least one peptide pool (**Figure 5F**). No benefit of targeting N, GP4GP5M and NSP1 β to XCR1 nor of targeting N and GP4GP5M to CD11c was obtained.

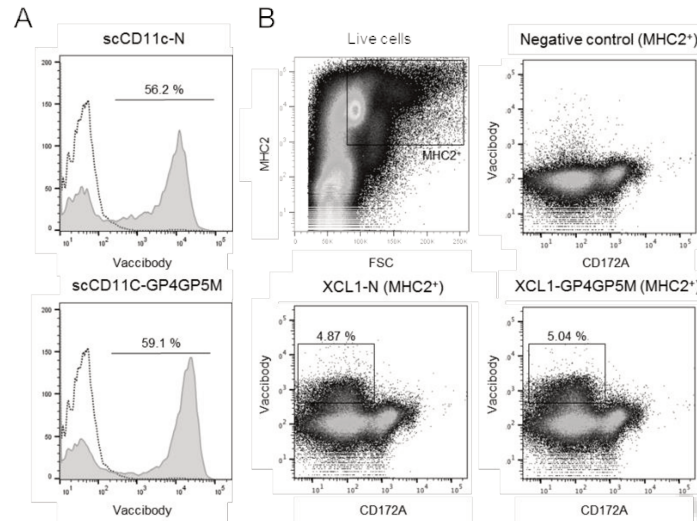


Figure 3. Binding of VB-PRRSV-AG to low density pig PBMCs. Low density PBMCs were incubated with 5 - 10 times concentrated supernatants containing VB, i.e. Ctrl-mCherry as negative control, XCL1-N, XCL1-GP4GP5M, scCD11c-N and scCD11c-GP. The VB were revealed with anti-CH3 mAb followed by A488-GAM IgM. Dead cells were excluded with DAPI. **A.** The scCD11c-N and scCD11c-GP staining was analyzed on FSC-Hi gated cells from 105 total cells. **B.** The low density PBMCs were co-stained for pig MHC class II (A647) and CD172A (APC-cy7) detection and the XCL1-N, XCL1-GP4GP5M staining was analyzed on whole live cells from 106 total cells.

A

Vaccines	Ctrl	DNA 3X groups DNA D0 + D29 + D62			MLV-only	DNA+MLV groups DNA D0 + MLV D29		
		XCL1	scCD11c	UT		XCL1	scCD11c	UT
DNA	-	pXCL1-N pXCL1-GP4GP5M pXCL1-NSP1β1 pXCL1-NSP1β2 pRdRp	pscCD11c-N pscCD11c-GP4GP5M pNSP1β pRdRp	pN pGP4GP5M pNSP1β pRdRp	-	pXCL1-N pXCL1-GP4GP5M pXCL1-NSP1β1 pXCL1-NSP1β2 pRdRp	pscCD11c-N pscCD11c-GP4GP5M pNSP1β pRdRp	pN pGP4GP5M pNSP1β pRdRp
MLV								

B

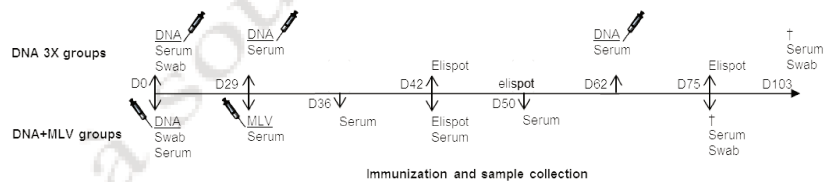


Figure 4. Immunization protocol with DNA only (DNA 3X) and with DNA-MLV prime-boost (DNA+MLV). **A.** One-month-old pigs (8 per group) of the DNA 3X and DNA-MLV groups received 400 μg of the plasmids listed in the table, on the same day (D0). The plasmids were formulated with PLGA NP and delivered intradermally using surface electroporation. The groups are named under the VB type used to target DC (XCL1 or scCD11c) or the untargeted antigens (UT) or under controls (not immunized with DNA). Note that in all groups, pRdRp is used as RdRp could not be targeted, and in the scCD11c group, pNSP1β coding for UT NSP1β is used. On D29 and D62, the DNA 3X groups were boosted with the same DNA plasmids as on D0. On D29, the 4 DNA+MLV groups were injected with MLV FL13b (105.5 TCID per pig) intramuscularly. **B.** The sampling and immunization schedules are reported on the time line: blood was collected on CPT tubes for ELISPOST assay on D42 and D75. The DNA+MLV groups were euthanized on D75 and the DNA 3X on D103. The sera were collected on D0, 29, 62, 103 in the DNA 3X groups and on D0, 29, 36, 42, 50 and 75 in the DNA+MLV groups. Nasal swabs were collected on D0 and D103 in the DNA groups and on D0 and D75 in the DNA+MLV group

4. A DNA-MLV prime-boost (DNA+MLV groups) broadens the IFN γ T cell response as compared to MLV-only, induces higher T cell responses as compared to DNA 3X, and does not show a benefit of APC-targeting on the IFN γ T cell response.

We hypothesized that a DNA-MLV prime-boost strategy could be able to enhance the T cell response induced by MLV and might be superior to a DNA-stand-alone strategy. We therefore compared the efficacy of this strategy to the DNA 3X's one. We immunized one-month-old pigs with the DNA plasmids on the same day, in the same housing and with the same plasmids as for the DNA 3X groups (**Figures 4A**). On day 29, the DNA+MLV pigs and MLV-only immunized pigs received MLV FL13b ($10^{5.5}$ TCID per pig) by the intramuscular route. PBMCs were collected on D13 after the MLV boost and processed similarly as described above for the DNA 3X groups. For all peptide pools except GP4GP5M, the MLV-only and DNA+MLV groups showed statistically significant IFN γ T cell response above the unimmunized control group (**Figure 5A, C, D, E**). Pigs of the DNA+MLV groups showed higher responses than pigs immunized with MLV-only but due to the heterogeneity of response, the difference did not reach statistical significance (**Figure 5A-E**). The MLV-only vaccinated pigs developed similar levels of IFN γ T cell response as the vaccinated DNA 3X pigs. Whereas 2 pigs of the MLV-only group did not present detectable T cell responses, all pigs of the DNA+MLV groups responded to at least 1 peptide pool (**Figure 5F**). These pig groups responded to more peptide pools than did the MLV-only and their respective DNA 3X ones (**Figure 5F**, statistically significant differences with Mann-Whitney test). Therefore, altogether the results indicate that the DNA-MLV prime-boost strategy induces broader IFN γ T cell response as compared to a DNA-stand-alone strategy or as MLV-only.

5. A DNA-MLV prime-boost potentiates the anti-N IgG response as compared to a MLV-only vaccine or to a DNA-stand-alone regimen and shows a benefit of XCR1 and CD11c-targeting.

N is an immuno-dominant B cell antigen which was successfully targeted to XCR1 and CD11c with VB. The IgG anti-N were detected in the sera with a robust commercial ELISA kit [37] [38]. In the DNA 3X groups, a low anti-N IgG response was detected after the first injection and it gradually increased with the boosting, except in the CD11c group where the third boost had no effect. The mean S/P ratio in the XCL1, scCD11c and UT group reached the maximal values 0.97 ± 0.41 , 0.19 ± 0.07 and 0.96 ± 0.66 respectively on D103 (**Figure 6A**).

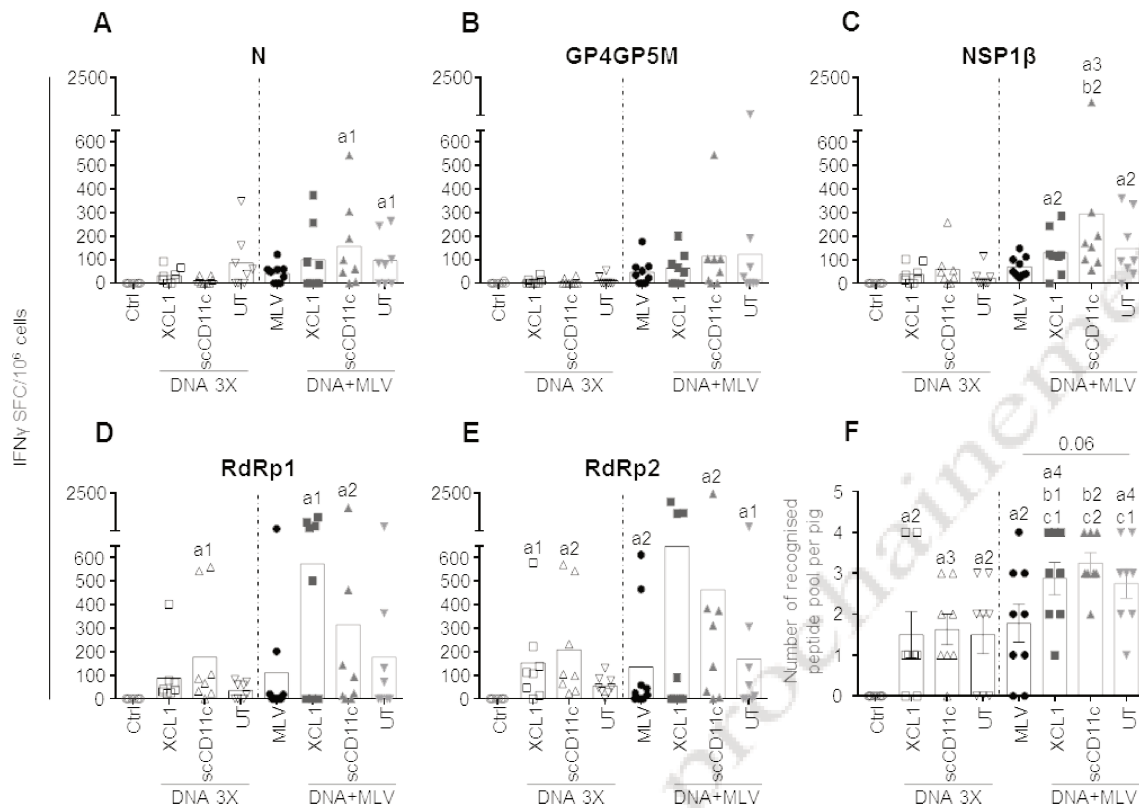


Figure 5. T cell responses induced by DNA 3X and DNA+MLV regimens. PBMCs were collected 13 days after the last boost in the DNA 3X (D75) and DNA+MLV (D42) groups and they were analyzed for IFN γ T cell response upon restimulation with overlapping peptide pools (10 μ g/mL) in ELISPOT assays. **A-E.** The responses to the N, GP4GP5M, NSP1 β , RdRp1 (peptide 1 to 40) and RdRp2 (peptide 41 to 80) peptide pools are shown. An irrelevant peptide (10 μ g/mL) was used as control. The mean number of spots from triplicates of stimulated minus control wells are shown (see Material and Methods). The mean number of spots across pigs per group is shown as a box. The plasmids used to immunize each group are listed **Figure 4**. Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test. The p value is indicated when close to significance. The letter a indicates significant differences with the non-vaccinated group, b with the MLV-only group, c with the respective DNA 3X group. Number 1 corresponds to $p < 0.05$, 2 to $p < 0.01$, 3 to $p < 0.005$.

The anti-N IgG response was strongly enhanced by in the DNA+MLV groups as compared to in the MLV-only, as soon as on D36 (i.e. 7 days after the MLV boost). The mean S/P ratio at D36 reached 1.14 ± 0.43 in the XCL1 group and 1.21 ± 0.92 in the CD11c group, which are higher values than in the DNA 3X at any time point (**Figure 6B**). The anti-N IgG response started to be detectable at D42 in the MLV-only group (i.e. 13 days after the boost, mean S/P ratio = 0.12 ± 0.08). At D50, the mean S/P ratio reached a maximum in the XCL1 and scCD11c prime-boost groups (4.64 ± 0.57 , 4.24 ± 0.79 .) whereas the value was much lower, i.e. 0.77 ± 0.34 , in the MLV-only group. Interestingly, the S/P ratios were higher in the XCL1 and scCD11c than in the UT prime-boost group at D50 ($p < 0.05$), as well as at D42 and D75 in the XCL1 group ($p = 0.06$ and < 0.05 respectively). As the MLV+DNA pigs were culled on D75, the duration of the anti-N IgG response in the three groups could not be evaluated beyond that time point. Overall this analysis shows that the DNA-MLV prime-boost strongly accelerated the anti-N IgG response induced by MLV and the magnitude of the anti-N IgG response was much higher with this regimen than with DNA 3X or MLV alone, in the time frame of the experiment. Furthermore, APC-targeting and especially XCR1 targeting potently enhanced the anti-N IgG response.

6. Anti-N IgG response in nasal secretions

So far, the DNA-MLV prime-boost strategy appears as the most potent one to induce broad IFN γ T cell response and high/rapid antibody response against PRRSV. As the achieved antibody magnitude is striking, this DNA-MLV prime-boost strategy might be used to protect the mucosa, the portal of entry of PRRSV. Although anti-N Abs are not protective, they can be considered as emblematic to evaluate the potency of the DNA-MLV for induction of mucosal antibodies. Besides, the GP4GP5M chimera does not induce measurable neutralizing antibodies, as published by others [33, 39]. No anti-N IgA were detectable in nasal swabs collected at D75 but anti-N IgG were detected with the commercial ELISA. **Figure 6C** shows that at D75, the level of anti-N IgG tended to reach the highest levels in the XCL1 group as compared to in the MLV-only group. This finding indicates that the prime-boost strategy, especially with XCR1-targeting of vaccine antigens, could be favorable to mucosal protection.

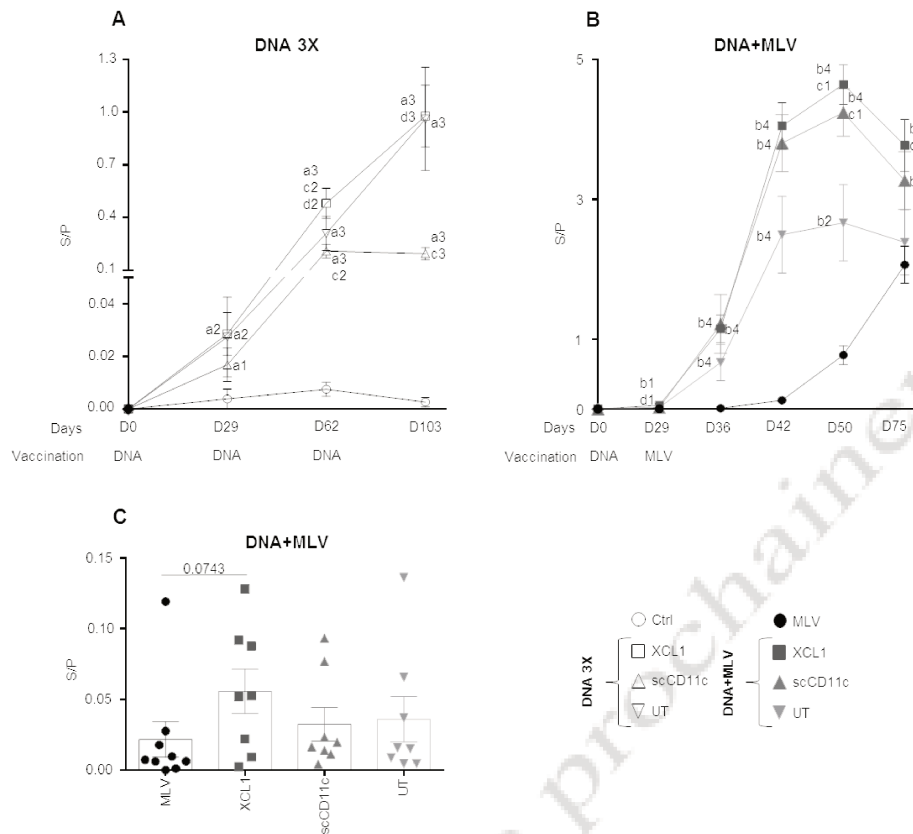


Figure 6. Anti-N IgG responses in serum and nasal secretions induced by DNA 3X and DNA+MLV regimens. A and B. Sera from the DNA 3X groups and from the DNA+MLV groups were collected on the indicated days and analyzed at a 1:40 dilution for anti-N IgG detection with the Ingezim PRRS 2.0 kit. The S/P ratios are reported as means \pm sem per group. The vaccine dates and types are shown. C. Nasal secretions were collected on D0 and D75 in the DNA+MLV groups. The secretions were analyzed at a 1:2 dilution for anti-N IgG detection with the Ingezim PRRS 2.0 kit. The S/P ratios for each pig per groups are shown and the mean of the group (box) \pm sem is shown. Statistically significant differences between 2 groups were calculated at each time point using the Mann Whitney non-parametric test. The letter a indicates significant differences with the non-vaccinated group, b with the MLV-only group, c with the UT groups. Number 1 corresponds to $p < 0.05$, 2 to $p < 0.01$, 3 to $p < 0.005$. The p value is indicated when close to significance.

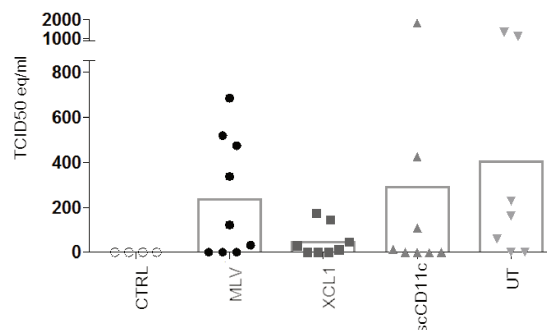


Figure 7. Detection of FL13b MLV RNA in the sera of immunised pigs. FL13b MLV was detected in sera with specific qRT-PCR on D50, i.e. 21 days post MLV injection. TCID50/ml equivalence was calculated with a viral standard curve (see Material and Methods). The limit of detection is calculated as being 5 TCID50/ml equivalent (TCID50 eq/ml). The mean (box) \pm sem is shown per group.

7. A DNA prime effect on MLV replication duration

MLV replication can lead to reversion to pathogenicity [5]. We therefore evaluated whether the DNA prime had any impact on MLV replication. MLV-FL13b was detected by TaqMan qRT-PCR in the pig sera of the DNA+MLV groups on D29, 36, 42 and 50. Whereas no difference between groups was found on D36 and 42 (**not shown**), a slight benefit of the DNA prime was observed on D50. Indeed 4 out of 9 pigs showed TCID₅₀ equivalents/ml > 300 in the MLV-only group, 2 out of 7 and 8 in the UT and scCD11c groups respectively and none in XCL1 group. Although the limited number of pigs per group was insufficient to provide statistically significant results, the DNA prime appears to reduce MLV replication, especially in the XCL1 group.

Discussion

Our results show that DNA vectors expressing a combination of conserved PRRSV antigens inoculated in pig dermis with cationic PLGA NP and surface electroporation induces moderate but substantial IFN γ T cell and antibody responses. Interestingly, we showed that the DNA priming with these vectors enhanced the breadth of the IFN γ T cell response and the level of anti-N IgG induced by MLV, in the time frame of our experiment. The antibody response induced with MLV raised slowly whereas the antibody response induced with DNA+MLV rapidly reaches very high levels and started to decline at D75. Given the constraints of the large animal experiment scheduling, pigs were culled at D75, what prevented us to determine the subsequent evolution of the antibody levels in the different groups. In any event in this time frame, we observed a benefit of targeting a PRRSV antigen to APCs, and especially to XCR1, to induce elevated amounts of antibodies, both in serum and secretions.

Our initial objective was to develop a PRRSV T cell vaccine, and we hoped to improve the T cell responses with APC-targeting. We did not achieve this goal, and we rather obtained higher antibody responses with this approach and only in the context of the prime-boost strategy. Of note, we only monitored the IFN γ T cell responses, and no other arms of the T cell response, which could behave differently than IFN γ T cell response upon APC-targeting. Several published works emphasize that the outcomes of DC targeting remain difficult to predict, especially in non-model species [40-42]. The T cell antigen epitope content probably strongly impacts on the efficacy of DC-targeting for inducing IFN γ T cell response: indeed,

contrasted results were obtained with DEC205 targeting of two different *Plasmodium vivax* antigens, with benefit on the IFN γ T cell response for one and no effect for the other [43]. Some antigens may include high amounts or potent regulatory T cell epitopes, affecting the outcome of DC-targeting, with variations between individuals also depending on their genetic make-up and their previous immune experience [44, 45]. In this study, only the N antigen and the GP4GP5M chimera could be efficiently expressed in the context of targeted vaccibodies; two parts of NSP1 β could be expressed with XCL1 VB but the levels of expression were low in HEK293 cells, and VB including RdRp, which revealed to be the most potent T cell antigen in our ELISPOT experiments, were not expressed in cells. A previous work with a GP4GP5M chimera indicated that IFN γ T cell response could be increased with DC-SIGN targeting [33], but these results were not confirmed by a second study using a different adjuvant, and the level of induced T cell response was quite low [39]. We observed that this chimera is inefficient at inducing IFN γ T cell response in our setting, whether targeted or not. Finally, NSP5 would have been a very interesting T cell antigen to be used in a DNA-MLV prime-boost strategy, as NSP5 is the most conserved and dominantly recognized T cell antigen in pigs infected with subtype 1 and 3 viruses. However, NSP5 includes many predicted transmembrane domains and was therefore not suitable for expression with VB.

Besides the effect of the antigen properties, our delivery method with cationic PLGA NP and surface electroporation may interfere on the effect of APC-targeting for improving IFN γ T cell responses. Indeed, cationic PLGA NP may have favored the direct transfection of APC in skin and may mask the benefit of DC targeting (**Bernelin et al, article 2**). In addition, our delivery method may have a potent adjuvant influence, leading to a maximal response which cannot be exceeded with DC-targeting, as previously shown with gradation of plasmid doses encoding for DEC205-targeted antigens in the mouse [20]. A different delivery mode, such as needle-less jet delivery which may be less inflammatory, and /or omission of NP may modify the outcome of antigen-DC targeting. We are in the process to evaluate this hypothesis.

Our DNA constructs used as a stand-alone strategy induced anti-N responses to moderate but substantial levels after 3 injections. However, no boosting effect was obtained with the third boost using the scCD11c-N VB vector. The inefficacy of homologous boosting has been previously reported when CLEC9A was targeted with a xenogenic antibody [46]. Indeed, the xenogenic antibody sequences, here represented by mouse scFv, are presumably intrinsically immunogenic in the pig and the anti-scFv response mounted by the pig could block the boosting effect, as demonstrated in the CLEC9A-targeting study [46]. Conversely pXCL1-N

VB, which contain syngeneic pig XCL1 sequences, are not unfavorable in successive boosting. In the CLEC9A-targeting experiment, the authors showed that DC-targeting was particularly efficient when used with a heterologous boost [46]. Indeed, in our study, the DNA-MLV prime-boost strategy potently favored the antibody response, and the response was promoted by XCR1 and CD11c targeting, and even in mucosa. XCR1-targeting appears to be particularly suitable to promote antibody response both in mice [22, 47] and in pigs as previously shown by us [48]. It has also been proposed that XCR1-targeting with ligands that induce a slow internalization kinetics of XCR1 [47] allows a prolonged antigenic interaction, leading to efficient activation of the BCR. However, a slow internalization kinetics of XCR1 would not be favorable to CD8⁺ T cell activation. It is possible that in the setting that we used in pigs, the binding properties of XCL1 VB favors more the antibody response than the CD8⁺ T and CD4⁺ Th1 cell response. As said in the results, the anti-N IgG response was monitored as a "emblematic" antibody response. However protective antigen determinants, yet to be identified, could be used in VB in a DNA-MLV prime-boost strategy to elicit strong neutralizing antibodies, and ideally broadly neutralizing ones, which exist in some PRRSV-infected pigs [49].

A DNA-MLV prime-boost strategy, using DNA vectors encoding a truncated N devoid of immunomodulatory property, has been previously documented to promote IFN γ T cell responses and reduce the N-specific T regulatory response induced by MLV [50]. In our experiment, we could not detect IL-10 production in the supernatants of re-stimulated cells and we therefore could check if our multiple PRRSV antigens also had the interesting property to limit the immune inhibition induced by PRRSV MLV.

Finally, the DNA prime may also be beneficial to reduce MLV replication, as found especially in the XCR1 group. If confirmed with larger number of pigs, this property would be very valuable in improving MLV safety while enhancing their immune potency.

Our work shows that the DNA-MLV prime-boost strategy, which broadens the T cell response and increases the antibody response, is a promising strategy to control PRRSV infection, especially in heavily infected areas with PRRSV circulation. Notably, DNA could be administered to neonatal piglets under colostrum immunity, as DNA vaccination appears insensitive to the effects of maternal antibodies [51]. The primed piglets could then be vaccinated after weaning, being optimally armed against circulating PRRSV in fattening units.

Acknowledgements

We are grateful to Bjarne Bogen and Marc Dalod for inspiring this study. We warmly thank Frédéric Martinon for his guidance with surface electroporation and for lending the CUY-21 apparatus and Virginie Jakob for preparing the NPs. We are very grateful to all animal technicians involved in the pig experiment at the Plateforme d'Infectiologie Expérimentale PFIE-Nouzilly, France and we thank them for their high level of professionalism and dedication to animal experimentation and welfare.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Programme for research, technological development and demonstration under the Grant Agreement n°633184. This publication reflects the views only of the author, and not the European Commission (EC). The EC is not liable for any use that may be made of the information contained herein. We thank the DIM-ASTREA and the Department of Animal Health at INRA for the financial support allowing the purchase of the ispot/fluorospot.

References

- Alvarez B, Poderoso T, Alonso F, Ezquerro A, Dominguez J, Revilla C. Antigen targeting to APC: from mice to veterinary species. *Dev Comp Immunol.* 2013;41(2):153-63. doi: 10.1016/j.dci.2013.04.021. PubMed PMID: 23648645.
- Amorim KN, Rampazo EV, Antonioli R, Yamamoto MM, Rodrigues MM, Soares IS, et al. The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205+ dendritic cells. *Sci Rep.* 2016;6:39250. doi: 10.1038/srep39250. PubMed PMID: 28000705.
- Baranowska M, Hauge AG, Hoornaert C, Bogen B, Grodeland G. Targeting of nucleoprotein to chemokine receptors by DNA vaccination results in increased CD8(+)-mediated cross protection against influenza. *Vaccine.* 2015;33(49):6988-96. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.094. PubMed PMID: 26387432.
- Bautista EM, Molitor TW. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Arch Virol.* 1999;144(6):1191-200. PubMed PMID: 10446652.
- Bernelin-Cottet C, Deloizy C, Stanek O, Barc C, Bouguyon E, Urien C, et al. A Universal Influenza Vaccine Can Lead to Disease Exacerbation or Viral Control Depending on Delivery Strategies. *Front Immunol.* 2016;7:641. doi: 10.3389/fimmu.2016.00641. PubMed PMID: 28082980.
- Biernacka K, Podgorska K, Tyszka A, Stadejek T. Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum samples. *Res Vet Sci.* 2018;121:40-5. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.10.005. PubMed PMID: 30316015.
- Burgara-Estrella A, Diaz I, Rodriguez-Gomez IM, Essler SE, Hernandez J, Mateu E. Predicted peptides from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are able to induce IFN-gamma and IL-10. *Viruses.* 2013;5(2):663-77. Epub 2013/02/26. doi: 10.3390/v5020663. PubMed PMID: 23435238; PubMed Central PMCID: PMC3640520.
- Castro FV, Tutt AL, White AL, Teeling JL, James S, French RR, et al. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *European journal of immunology.* 2008;38(8):2263-73. Epub 2008/07/25. doi: 10.1002/eji.200838302. PubMed PMID: 18651710.
- Cohn L, Chatterjee B, Esselborn F, Smed-Sorensen A, Nakamura N, Chalouni C, et al. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *The Journal of experimental medicine.* 2013;210(5):1049-63. Epub 2013/04/10. doi: 10.1084/jem.20121251. PubMed PMID: 23569326; PubMed Central PMCID: PMC3646496.
- Contreras V, Urien C, Guiton R, Alexandre Y, Vu Manh TP, Andrieu T, et al. Existence of

- CD8{alpha}-Like Dendritic Cells with a Conserved Functional Specialization and a Common Molecular Signature in Distant Mammalian Species. *J Immunol.* 2010;185:3313-25. doi: jimmunol.1000824 [pii] 10.4049/jimmunol.1000824.
- Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med.* 2010;207(6):1283-92. doi: 10.1084/jem.20100223. PubMed PMID: 20479118; PubMed Central PMCID: PMC2882835.
- Darwich L, Gimeno M, Sibila M, Diaz I, de la Torre E, Dotti S, et al. Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains. *Vet Microbiol.* 2011;150(1-2):49-62. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.01.008. PubMed PMID: 21310555.
- Deloizy C, Bouguyon E, Fossum E, Sebo P, Osicka R, Bole A, et al. Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: Reagents to porcine CD11c and XCR1. *Dev Comp Immunol.* 2016;65: 31-40. doi: 10.1016/j.dci.2016.06.015. PubMed PMID: 27345169.
- Deloizy C, Fossum E, Barnier-Quer C, Urien C, Chrun T, Duval A, et al. The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin. *Sci Rep.* 2017;7(1):7639. doi: 10.1038/s41598-017-07372-9. PubMed PMID: 28794452; PubMed Central PMCID: PMC5550447.
- Fossum E, Grodeland G, Terhorst D, Tveita AA, Vikse E, Mjaaland S, et al. Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8(+) T-cell responses against influenza virus. *European journal of immunology.* 2015;45(2):624-35. Epub 2014/11/21. doi: 10.1002/eji.201445080. PubMed PMID: 25410055.
- Fredriksen AB, Bogen B. Chemokine-idiotypic fusion DNA vaccines are potentiated by bivalency and xenogeneic sequences. *Blood.* 2007;110(6):1797-805. doi: 10.1182/blood-2006-06-032938. PubMed PMID: 17540847.
- Frydas IS, Trus I, Kvisgaard LK, Bonckaert C, Reddy VR, Li Y, et al. Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Vet Res.* 2015;46(1):37. Epub 2015/04/18. doi: 10.1186/s13567-015-0166-3. PubMed PMID: 25885416; PubMed Central PMCID: PMC4367851.
- Grodeland G, Mjaaland S, Tunheim G, Fredriksen AB, Bogen B. The Specificity of Targeted Vaccines for APC Surface Molecules Influences the Immune Response Phenotype. *PLoS one.* 2013;8(11):e80008. Epub 2013/11/19. doi: 10.1371/journal.pone.0080008. PubMed PMID: 24244595; PubMed Central PMCID: PMC3823800.
- Gudjonsson A, Lysen A, Balan S, Sundvold-Gjerstad V, Arnold-Schrauf C, Richter L, et al. Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1+ Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses. *J Immunol.* 2017. doi: 10.4049/jimmunol.1601881. PubMed PMID: 28228559.
- Kastenmuller W, Kastenmuller K, Kurts C, Seder RA. Dendritic cell-targeted vaccines - hope or hype? *Nature reviews Immunology.* 2014;14(10):705-11. Epub 2014/09/06. doi: 10.1038/nri3727. PubMed PMID: 25190285.
- Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine.* 2009;27(28):3704-18. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.022. PubMed PMID: 19464553.
- Kreutz M, Tacke PJ, Figdor CG. Targeting dendritic cells--why bother? *Blood.* 2013;121(15):2836-44. doi: 10.1182/blood-2012-09-452078. PubMed PMID: 23390195.
- Kurts C. CD11c: not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target. *European journal of immunology.* 2008;38(8):2072-5. Epub 2008/07/25. doi: 10.1002/eji.200838645. PubMed PMID: 18651699.
- Losikoff PT, Mishra S, Terry F, Gutierrez A, Ardito MT, Fast L, et al. HCV epitope, homologous to multiple human protein sequences, induces a regulatory T cell response in infected patients. *J Hepatol.* 2015;62(1):48-55. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.026. PubMed PMID: 25157982.
- Lowe JE, Husmann R, Firkins LD, Zuckermann FA, Goldberg TL. Correlation of cell-mediated immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome in commercial herds. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226(10):1707-11. PubMed PMID: 15906573.
- Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016;4:129-54. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111025. PubMed PMID: 26646630.
- Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J.* 2008;177(3):345-51. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.05.022. PubMed PMID: 17644436.
- Meier WA, Galeota J, Osorio FA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. Gradual

- development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*. 2003;309(1):18-31. PubMed PMID: 12726723.
- Mokhtar H, Eck M, Morgan SB, Essler SE, Frossard JP, Ruggli N, et al. Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity. *Vaccine*. 2014;32(50):6828-37. Epub 2014/05/23. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.054. PubMed PMID: 24844151.
- Mokhtar H, Pedrera M, Frossard JP, Biffar L, Hammer SE, Kvisgaard LK, et al. The Non-structural Protein 5 and Matrix Protein Are Antigenic Targets of T Cell Immunity to Genotype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Front Immunol*. 2016;7:40. doi: 10.3389/fimmu.2016.00040. PubMed PMID: 26909080; PubMed Central PMCID: PMC4755262.
- Nchinda G, Kuroiwa J, Oks M, Trumpfheller C, Park CG, Huang Y, et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1427-36. doi: 10.1172/JCI34224. PubMed PMID: 18324335; PubMed Central PMCID: PMC2263146.
- Ooi HS, Kwo CY, Wildpaner M, Sirota FL, Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, et al. ANNIE: integrated de novo protein sequence annotation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W435-40. doi: 10.1093/nar/gkp254. PubMed PMID: 19389726; PubMed Central PMCID: PMC2703921.
- Park C, Seo HW, Han K, Kang I, Chae C. Evaluation of the efficacy of a new modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Fostera PRRS) against heterologous PRRSV challenge. *Vet Microbiol*. 2014;172(3-4):432-42. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.030. PubMed PMID: 24970363.
- Park HY, Tan PS, Kavishna R, Ker A, Lu J, Chan CEZ, et al. Enhancing vaccine antibody responses by targeting Clec9A on dendritic cells. *NPJ Vaccines*. 2017;2:31. doi: 10.1038/s41541-017-0033-5. PubMed PMID: 29263886; PubMed Central PMCID: PMC5674066. PubMed PMID: 20702727.
- Maisonnasse P, Bouguyon E, Piton G, Ezquerro A, Urien C, Deloizy C, et al. The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunol*. 2016;9:835-49. doi: 10.1038/mi.2015.105. PubMed PMID: 26530136.
- Radford KJ, Caminschi I. New generation of dendritic cell vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(2):259-64. PubMed PMID: 23291951; PubMed Central PMCID: PMC3859744.
- Rahe MC, Murtaugh MP. Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses*. 2017;9(6). doi: 10.3390/v9060148. PubMed PMID: 28608816.
- Renukaradhya GJ, Meng XJ, Calvert JG, Roof M, Lager KM. Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction. *Vaccine*. 2015;33(33):4069-80. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.06.092. PubMed PMID: 26148878.
- Robinson SR, Rahe MC, Gray DK, Martins KV, Murtaugh MP. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralizing antibodies provide in vivo cross-protection to PRRSV1 and PRRSV2 viral challenge. *Virus Res*. 2018. doi: 10.1016/j.virusres.2018.01.015. PubMed PMID: 29408442.
- Salguero FJ, Frossard JP, Rebel JM, Stadejek T, Morgan SB, Graham SP, et al. Host-pathogen interactions during porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection of piglets. *Virus Res*. 2015;202:135-43. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.026. PubMed PMID: 25559070.
- Sattler T, Wodak E, Revilla-Fernandez S, Schmol F. Comparison of different commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in serum. *BMC Vet Res*. 2014;10:300. doi: 10.1186/s12917-014-0300-x. PubMed PMID: 25518885; PubMed Central PMCID: PMC4276257.
- Shortman K, Lahoud MH, Caminschi I. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. *Exp Mol Med*. 2009;41(2):61-6. doi: 10.3858/em.2009.41.2.008. PubMed PMID: 19287186; PubMed Central PMCID: PMC2679330.
- Subramaniam S, Pineyro P, Derscheid RJ, Madson DM, Magstadt DR, Meng XJ. Dendritic cell-targeted porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens adjuvanted with polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) induced non-protective immune responses against heterologous type 2 PRRSV challenge in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2017;190:18-25. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.07.003. PubMed PMID: 28778318.
- Subramaniam S, Pineyro P, Tian D, Overend C, Yugo DM, Matzinger SR, et al. In vivo targeting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen through porcine DC-SIGN to dendritic cells elicits antigen-specific CD4T cell immunity in pigs. *Vaccine*. 2014;32(50):6768-75. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.005. PubMed PMID: 25446829.
- Suradhat S, Wongyanin P, Sirisereewan C, Nedumpun T, Lumyai M, Triyarach S, et al. Transdermal delivery of plasmid encoding truncated nucleocapsid protein enhanced PRRSV-

specific immune responses. *Vaccine*. 2015. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.043. PubMed PMID: 26724543.

Tenbusch M, Ignatius R, Nchinda G, Trumpfheller C, Salazar AM, Topfer K, et al. Immunogenicity of DNA vaccines encoding simian immunodeficiency virus antigen targeted to dendritic cells in rhesus macaques. *PLoS One*. 2012;7(6):e39038. doi: 10.1371/journal.pone.0039038. PubMed PMID: 22720025; PubMed Central PMCID: PMC3373620.

Tregoning JS, Kinnear E. Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6). doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0028-2014. PubMed PMID: 26104452.

Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, et al. Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J Intern Med*. 2012;271(2):183-92. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02496.x. PubMed PMID: 22126373; PubMed Central PMCID: PMC3261312.

van Rooij EM, Moonen-Leusen HW, de Visser YE, Middel WG, Boersma WJ, Bianchi AT. A DNA vaccine coding for gB and gD of pseudorabies virus (suid herpes type 1) primes the immune system in the presence of maternal immunity more efficiently than conventional vaccines. *Vaccine*. 2006;24(9):1264-73. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.041. PubMed PMID: 16289276.

Vu Manh TP, Elhrouzi-Younes J, Urien C, Ruscanu S, Jouneau L, Bourge M, et al. Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. *Front Immunol*. 2015;6:299. doi: 10.3389/fimmu.2015.00299. PubMed PMID: 26150816; PubMed Central PMCID: PMC34473062.

Welsh RM, Selin LK. No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(6):417-26. doi: 10.1038/nri820. PubMed PMID: 12093008.

Article à soumettre prochimement

Article n°4 : « Une primo-vaccination à ADN nu potentialise les réponses immunes induites par un vaccin atténué (MLV) contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin mais n'induit pas de protection hétérologue»

Journal ciblé : Viruses | impact factor in 2017 : 3,761

L'**article 3** a montré que notre stratégie prime-boost ADN-MLV, avec des vaccins ADN associés aux PLGA NP était efficace pour étendre la réponse lymphocytaire T et augmenter la réponse anticorps contre le PRRSV chez le porc, et se révèle donc supérieure à la stratégie ADN ou MLV seuls. Le ciblage des antigènes aux APC augmente et accélère la réponse humorale IgG anti-N, mais est sans effet sur la réponse lymphocytaires T IFN γ .

Dans ce dernier article, nous avons visé une stratégie basée sur nos résultats des **articles 2 et 3**, qui soit adaptable à la vaccination sur le terrain. Nous avons décidé de ne pas utiliser les nanoparticules cationiques PLGA NP pour différentes raisons:

- l'emploi de PLGA NP présente des problèmes de stabilité, entrainerait des lourdeurs de contrôles qualités à mettre en place, des complexités au niveau de l'étape industrielle de fabrication, et au niveau de l'enregistrement.

- l'absence d'amélioration de la réponse lymphocytaire T par l'APC-targeting nous a fait supposer que les nanoparticules pouvaient interférer avec son effet.

- nous avons également identifié une méthode de délivrance de l'ADN, par jet sous pression (Pharmajet Tropis® (PJ)), qui s'était montrée efficace chez le porc dans un article publié fin 2016 et qui apparait beaucoup mieux adapté à une utilisation sur le terrain que l'électroporation (EP). Toutefois l'emploi du PJ qui nécessite d'injecter de l'ADN concentré présentait des risques de précipitation avec les PLGA NP.

L'objectif de l'**article 4** est d'améliorer le mode d'administration des vaccins à ADN en complément de l'**article 2**, et d'évaluer l'efficacité de la stratégie ADN-MLV, cette fois avec de l'ADN nu, administré avec EP ou PJ, avec ciblage ou non des antigènes au XCR1 qui s'était avéré le plus prometteur dans l'**article 3**.

Nous avons d'abord comparé l'efficacité de transfection d'un plasmide codant la luciférase (pLuc) dans la peau de porc par PJ et EP. Nous avons montré que pLuc est exprimé dans les cellules de la peau après injection par PJ avec une meilleure efficacité qu'EP. Vingt quatre heures après l'administration par PJ, nous avons détecté des niveaux beaucoup plus faibles d'IL-1 β et d'IL-8 sécrétés par les biopsies qu'après EP. Nous avons immunisé des porcs âgés d'un mois avec l'ADN par EP ou PJ, codant les VB-XCL1 (XCL1-EP ou XCL1-PJ) ou les antigènes du PRRSV non ciblés (UT-EP ou UT-PJ) Un boost avec un MLV en intramusculaire a été injecté un mois plus tard. Nous avons deux groupes de références : un qui n'est pas immunisé (Ctrl) et un qui ne reçoit que le MLV (MLV-FL13b). Quinze jours

après le boost, nous avons stimulé les PBMC des porcs avec les peptides chevauchants de 20 mers utilisés dans les **articles 2** et **3**. A la différence de l'**article 3**, les réponses lymphocytaires T IFN γ étaient du même ordre entre les groupes MLV-FL13b seul et ADN-MLV et aucun bénéfice du DC-targeting n'a été observé. Cette différence par rapport à l'**article 3** pourrait être liée à l'emploi de l'ADN nu, sans PLGA-NP. Par contre, comme dans l'**article 3**, la stratégie ADN-MLV a induit une réponse humorale IgG anti-N plus rapide et plus forte que MLV-FL13b et nous retrouvons également un bénéfice du ciblage de XCR1 sur la réponse humorale IgG anti-N, bien qu'un peu moins nette que dans l'**article 3**. Vingt-quatre jours après le boost, nos partenaires du laboratoire de référence du PRRSV (ANSES, Ploufragan) ont détecté des anticorps dirigés contre les protéines d'enveloppe (env) virale dans les sera des groupes ADN-MLV et pas dans le groupe MLV-FL13b. Ces résultats montrent que la stratégie ADN-MLV, avec du ADN nu, a un effet immuno-potentiateur sur le MLV seul, révélé par l'augmentation des réponses anticorps anti-N et anti-env, bien qu'il n'y ait pas d'effet sur les réponses lymphocytaires T IFN γ . D'autres réponses immunes, non mesurées, ont possiblement été stimulées, et pourraient avoir un effet sur la réplication virale d'un challenge hétérologue.

Vingt-neuf jours après le boost, nous avons réalisé une épreuve infectieuse des porcs avec une souche hétérologue au MLV-FL13b administrée par la voie intranasale, la souche FL07. Une légère augmentation de température a été mesurée après trois jours dans le groupe Ctrl. Les autres groupes ont montré une plus faible augmentation de la température et spécialement dans les groupes PJ. Nous avons observé une diminution de la charge virale dans les sera et les sécrétions nasales de tous les groupes, mais cette diminution n'a pas été renforcée dans les groupes ADN-MLV par rapport à MLV-FL13b seul. Malgré la réduction de charge virale dans tous les groupes, des anticorps neutralisants n'étaient pas détectables. Enfin, nos données actuelles ne nous ont pas permis de trouver de corrélats immunologiques avec la protection partielle hétérologue obtenue. La protection obtenue n'est donc pas associée à des anticorps neutralisants détectables, ni à l'intensité des réponses lymphocytaires T IFN γ . Toutefois, comme nous n'avons pas pu induire de réponses lymphocytaires T supérieures avec la stratégie ADN-MLV prime-boost avec de l'ADN nu, nous n'avons pas pu déterminer si l'augmentation du niveau et de l'étendue de ces réponses peut avoir un effet bénéfique à la protection hétérologue. Enfin ces résultats montrent que des corrélats immunologiques de protection hétérologue sont à découvrir pour développer des stratégies vaccinales adaptées.

Dans ce travail, j'ai participé à l'administration des plasmides dans les porcs (unité Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI), Jouy-en-Josas et Plate-Forme d'Infection Expérimentale (PFIE) de Nouzilly) et à la collecte des prélèvements. J'ai analysé l'expression des plasmides in vivo. Le dosage des cytokines en multiplex a été fait par Fany Blanc (GABI, Jouy-en-Josas). Les ELISA et les productions de plasmides ont été partagées avec Céline Urien. J'ai pris en charge totalement l'analyse des réponses lymphocytaires T IFN γ . Les analyses des anticorps neutralisants et anti-env ont été faites nos partenaires bretons (équipe d'Olivier Bourry, ANSES, Ploufragan). Les analyses de charge virale ont été faites par Céline Urien. Et les corrélats ont été établis par Luc Jouneau (INRA, Jouy-en-Josas).

J'ai contribué à la mise en forme des résultats de l'article.

A DNA prime immuno-potentiates a modified live vaccine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus but does not improve heterologous protection

Cindy Bernelin-Cottet^a, Céline Urien^a, Maxence Fretaud^a, Christelle Langevin^a, Ivan Trus^b, Luc Jouneau^a, Fany Blanc^c, Céline Barc^d, Olivier Boulesteix^d, Marylin Dysart^e, Patricia Renson^f, Sophie Mahe^f, Elisabeth Studsrub^g, Agnete Brunsvik-Fredriksen^g, Hans Nauwynck^b, Nicolas Bertho^{a1}, Olivier Bourry^f, and Isabelle Schwartz-Cornil^{a2}.

^aVIM-INRA-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

^bLaboratory of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

^cGABI-INRA-AgroParisTech-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

^dINRA, UE1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, PFIE, 37380 Nouzilly, France

^ePharmajet, 400 Corporate Circle Suite N, Golden, CO 80401, USA

^fAnses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzane, Unité Virologie et Immunologie

^gVaccibody AS, Gaustadalleen 21, Oslo 0349, Norway.

²**Corresponding author:** Isabelle Schwartz-Cornil, isabelle.schwartz@inra.fr

Running title: DNA-MLV prime against heterologous challenge with PRRSV

¹**Current address:** BIOEPAR, INRA, Oniris, Université Bretagne Loire, 44307, Nantes, France.

Abstract

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), a RNA virus inducing abortion in sows and respiratory disease in piglets, is a leading infectious cause of economic losses in the swine industry. Modified live vaccines (MLVs) represent a major control measure, but their efficacy is often compromised by the high genetic diversity of circulating viruses, leading to vaccine escape variants in the field. In this study, we hypothesized that a DNA prime with naked plasmids encoding PRRSV antigens with conserved T cell epitopes may improve the protection of MLV against a heterologous challenge. Plasmids were delivered with surface electroporation or needle-free jet injection and European strain-derived PRRSV antigens were targeted or not to a dendritic cell receptor XCR1. Compared to MLV-alone, the DNA-MLV prime-boost regimen slightly improved the IFN γ T cell response, and substantially increased the B-cell response against envelop determinants and the nucleoprotein, especially when DC-targeted for the latter. Despite this immuno-potential, the DNA-MLV regimen did not further decrease the serum viral load nor the nasal viral shedding over MLV-alone. Finally, the heterologous protection, achieved in absence of detectable effective neutralizing antibodies, was not correlated to the measured antibody nor to the IFN γ T cell response, indicating that immune correlates of protection still need to be identified. This study shows that a DNA prime immuno-potentiates a MLV more on the B than on the T cell response side, and remains to be improved to achieve cross-protective properties.

Introduction

The Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus (PRRSV), a positive single stranded RNA enveloped virus of the arteriviridae family, is responsible for high economical losses in the swine industry. The PRRSV induces reproductive failures in late gestation in sows and respiratory disease in growing and finishing piglets, resulting in poor growth performance (Butler, Lager et al. 2014, Lunney, Fang et al. 2016). The PRRSV RNA genome includes 10 open reading frames (ORFs), which encode for 7 structural proteins and 14 nonstructural proteins. Two distinct genotypes exist which present only 60% genomic sequence identity, with Type 1 being dominant in Europe and Type 2 in America. Both genotypes co-exist in Asia with frequent emergence of highly pathogenic strains. Among European strains, Eastern strains have emerged that display high virulence and cause large outbreaks, whereas circulating Western strains generally display low virulence and more insidious disease. The Eastern and Western strains are genetically divergent and grouped in subtypes 3 and 1 respectively (Shi, Lam et al. 2010). This genetic diversity is related to the high dynamics of PRRSV genome, which continuously and rapidly evolves, generating new variants and expanding its diversity which is the main hurdle to effective prevention and control of PRRS through vaccination (Shi, Lam et al. 2010). Modified live vaccines (MLVs) obtained by serial in vitro passages for attenuation are currently the mostly used vaccines, as they can reduce disease severity as well as the duration of viremia (Lyo 2015, Renukaradhya, Meng et al. 2015). However, the MLVs' efficacy is greater for homologous strains and can decline dramatically for genetically unrelated heterologous PRRSV strains (Lyo 2015, Renukaradhya, Meng et al. 2015).

T cell-mediated immunity has been proposed to be involved in the heterologous protective efficacy of MLVs against diverging strains (Martelli, Gozio et al. 2009). Interestingly, T cell epitopes from different PRRSV ORFs have been described that are conserved through European distant strains (Mokhtar, Eck et al. 2014). In order to enhance and broaden the T-cell mediated immunity induced by MLVs, we previously used a DNA-MLV prime-boost strategy with plasmids encoding PRRSV antigens (PRRSV-AG) including conserved T cell epitopes (NSP1, RdRp, M-derived antigens) as well as the B cell immunodominant nucleoprotein N from a recent Western European strain (Bernelin et al, DNA-prime paper). In addition, another group had shown that a DNA prime with a plasmid encoding N or truncated T reduced the potentially negative Treg response induced by a Type 2 MLV; this immunomodulatory strategy with N-encoding plasmids could be beneficial to MLV's efficacy

(Suradhat, Wongyanin et al. 2015). In our previous study, we administered plasmids encoding PRRSV-AG combined to cationic poly-lactoglycolide acid (PLGA) nanoparticles (NPs), intradermally with surface electroporation (EP), as this regimen appeared as most efficient to induce T cell responses in pigs (Bernelin et al, article 2). We found that this DNA prime broadened the T cell response and potentially enhanced the anti-N IgG response induced by MLV. Furthermore, when PRRSV-AG were expressed in vaccibody (VB) platforms targeted to XCR1, a receptor selectively expressed by a dendritic (DC) cell subset across species (Croizat, Tamoutounour et al. 2011), the anti-N IgG response was further enhanced. However, the IFN γ T cell response against the different PRRSV-AG was not significantly augmented by XCR1-targeting (Bernelin et al, DNA-prime paper). The use of nanoparticles, which may have favored the direct transfection of DCs, might have masked the effect of antigen-targeting to XCR1 for promoting T cell responses. Furthermore, DNA vaccine formulation with nanoparticles leads to complexity and additional cost at the manufacture stage, and raises issues of stability, quality and standardization. In addition, surface EP, although very efficient, is not yet adapted to vaccine delivery in veterinary field conditions. A painless intradermal jet delivery device has been shown to be particularly efficient to induce high neutralizing antibody responses in pigs using DNA encoding the influenza hemagglutinin antigen (Grodeland, Fredriksen et al. 2016) and such a convenient delivery, now licensed for human use, could be adapted to field use for veterinary applications. In the present study, we evaluated the T and B cell responses induced by a DNA-MLV prime-boost strategy with plain DNA vaccines administered using surface EP compared to jet delivery and coding for PRRSV-AG targeted or not to XCR1. We also assessed whether such DNA-MLV prime-boost strategy would enhance the cross-protection against a distant European PRRSV strain.

Materials and Methods

Antibodies (Abs)

The anti-pig IFN γ mouse P2G10 mAb (capture), biotinylated anti-pig IFN γ P2G11 mAb and alkaline phosphatase conjugated-streptavidin were from MabTech AB (Nacka Strand, Sweden). The anti-pig MHC class II MSA3 mAb was purchased from Washington State University Antibody. The anti-mCherry rabbit IgG was purchased from Rockland (#600-401-P16). The Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG was from ThermoFisher Scientific (#A-11012).

Viruses

The PRRSV genotype 1 subtype 13V091 (FL13) and 07V063 (FL07) strains have been described previously (Frydas, Trus et al. 2015). FL13 was attenuated by 73 in vitro passages in the MARC-145 cell line, clone F4. This attenuated strain, designated here as FL13b, was unable to infect primary alveolar macrophages, even after in vivo passages (H. Nauwynck personal communication) and is used in this work as MLV-FL13b. The FL07 strain was propagated on specific-pathogen-free alveolar macrophages.

DNA vectors

A mCherry encoding plasmid (mCherry2-N1, here referred as pmCherry) was obtained from Addgene under MTA. A firefly luciferase expression plasmid (pLuc) was kindly provided by Stéphane Biacchesi (INRA, France). The plasmid vectors encoding PRRSV antigens (AG) have been described previously (**Bernelin et al, submitted, articles 2 et 3**). Briefly the four vectors encoding for untargeted PRRSV antigen sequences from the FL13 isolate are: pN, pNSP1 β and pRdRp which encode the native proteins and pGP4GP5M which encodes a chimera that was derived from a previous publication (Subramaniam, Pineyro et al. 2014) and transposed to the FL13 strain. The four other plasmids which encode FL13 PRRSV AG targeted to XCR1 in the form of vaccibodies (VB) are pXCL1-N, pXCL1-GP4GP5M, pXCL1-NSP1 β 1 (AA1 to 202 of NSP1 β) and pXCL1-NSP1 β 2 (AA182 to 383 of NSP1 β). Plasmid productions for immunization were prepared using Endofree® Plasmid Giga Kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and were stored at -20°C until use.

Pig studies, ethic and authorizations

The piglets' mothers were checked to be PRRSV-seronegative with the commercial ELISA. The experiments with the pLuc plasmid (skin cell transduction) were approved by the COMETHEA ethic committee under the number APAFIS#13195-2017120408328722 v2 in accordance with national guidelines on animal use and performed at the Animal Genetics and Integrative Biology unit (GABI-INRA), France, under the accreditation number for animal

experimentation C78-719. Large White pigs (10 weeks of age) were obtained from INRA UEPR Rennes-Saint Gilles. The immunization experiments with PRRSV antigen-encoding plasmids was approved by the Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Val de Loire under the number APAFIS#4 13-20 15051418327338 v8 and were done at the Plateforme d'infection Expérimentale PFIE-INRA, Nouzilly, France, under the accreditation number for animal experimentation C37-1753 under A-BSL3 containment. Large White pigs (1 month of age) were obtained from the INRA conventional breeding unit Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière PAO-INRA, Nouzilly, France.

In vivo gene transfer

Pigs were anesthetized (2% isoflurane) to avoid animal discomfort with electroporation (EP) and to optimally control the quality of vaccine administration. Pig skin was cleaned with Vetedine soap (Vetoquinol), washed and dried. Part of the same experiment has been submitted to publication for a study comparing plain pLuc DNA administration to DNA on cationic poly-lactoglycolide nanoparticles and patch administration (**Bernelin et al, article 2**). Therefore, the values of the luminescence and of IL1 β secretion induced by EP delivery are the same ones as in that paper. For EP delivery, intradermal injection of pLuc and pmCherry (100 μ g in 100 μ l saline, 4 spots for pLuc and one for pmCherry) was done in the inguinal zone and EP was performed on the site of injection using the CUY 21 EDIT system (NEPA Gene, Japan). Disk electrodes (10 mm) were loaded with conductive gel (Alcyon, France) and 6 electric pulses were applied during 10 ms with 90 ms interval. Trolamine 0.6% (Biafine, France) was spread on the transfected zone right after administration. For needle-free jet delivery intradermal application (Tropis ID, Pharmajet®, <https://pharmajet.com/tropis-id/>), pLuc and pmCherry (100 μ g in 100 μ L saline) were administered in the lower thoracic (two spots per plasmid) and pLuc was also injected in the ischium zone (two spots). This method of administration is designated as PJ in this study. After 24 h, pigs were euthanized and skin biopsies were collected using an 8 mm disposable biopsy punch (Kai medical, Japan) after cleaning of the skin with Vetedine soap and Vetedine 10% solution. Control skin was harvested from the same zone (inguinal for the EP and thoracic zone PJ).

Detection of pLuc expression

Two biopsies transfected with pLuc per pig and per mode of delivery were cut into small pieces and lysed with 150 μ L of lysis reagent (Luciferase Assay System E1500, Promega). Bioluminescence was measured per each biopsy using the In Vivo Imaging System (IVIS-200, Xenogen, UK) after adding 100 μ L luciferine substrate. A region of interest (ROI) was manually selected and the intensity of luminescence (photons/sec/cm²) was recorded.

Detection of pmCherry expression

One biopsy from skin transfected with pmCherry was collected per pig (3 pigs) and per mode of delivery (EP and PJ) and fixed in buffered formalin 4%. Immunohistochemical staining and clearing were performed following the iDISCO+ protocol (Renier, Adams et al. 2016). Biopsies were incubated 7 days in each antibody solutions. The primary antibody (anti-mCherry rabbit IgG) and the secondary antibody (Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit) were diluted 1:500 in PBS. Before clearing, samples were incubated during 3 days with DAPI (Sigma-Aldrich, #D9542) diluted at 5 µg/ml. Biopsies were mounted under coverslips (Fisher-scientific) using spacers made with Picodent twinsil speed 22 dental paste (Picodent, Germany) and sealed with Dentalon plus dental paste (Phymep, France). Images were acquired with a Leica SP8 two-photon microscope using a HCX IRAPO L 25X/0,95NA water immersion objective (Leica microsystems). DAPI and Alexa Fluor 594 were both excited at 800 nm with a Chameleon Vision II laser (Coherent) and fluorescence was detected by NDD HyD detectors (Leica microsystems) with BP 525/50 and BP585/40 filters respectively.

Detection of inflammatory cytokines in pig transfected skin

For cytokine production assessment, two biopsies per pig and per mode of delivery were carefully washed in PBS and each placed in 1 mL RPMI + 10% FCS + 1 % antibiotic/antimycotic cocktail for 24h. Concentrations of IL-1β and IL-8 were assessed by cytometric beads assay for simultaneous detection of 12 swine cytokines (IL-4, IFNα, TNFα, IL-2, IL-8, IL-13, IL-12, IL-6, IFNγ, IL-10, IL-17, IL-1β) as described (Maisonasse, Bouguyon et al. 2016).

Immunization of pigs and infectious challenge

The animal experiment was authorized by the Val de Loire ethic committee under the number APAF1S#4 13-20 15051418327338 v8, at the PFIE-INRA platform in Nouzilly which operates under the agreement #C371753. Pigs (1-month-old) were split in 8 groups including 8 or 9 piglets per group, respecting a balance between males and females, and taking their ascendance origin so that genetic biases between groups are minimal. The groups' description and the immunization schedule are shown in **Table 1**. On day 0 (D0), 4 groups of pigs were anesthetized (2% isoflurane) and were injected with the DNA plasmids (400 µg each), either with EP or with PJ, as described above. In the case of EP, DNA in 400 µL was injected in 3 spots and in the case of PJ, DNA in 200 µl was injected half in the costal zone and the other half in the ischium zone. Trolamine 0.6% (Biafine, France) was spread on the EP zone administration. On D34, the 4 DNA-vaccinated groups and an additional MLV-only group

received MLV-FL13b (105.5 TCID per pig) intramuscularly in 2 mL PBS + Ca²⁺Mg²⁺. On D63, all pigs including a control group were anesthetized with xylazine (Rompun, Bayer SAS) at 2 mg/kg et ketamine (Imalgene, Merial) at 10 mg/kg by the intramuscular route and they received 2 x 10⁵ TCID50 FL07 per pig by the intra-nasal route. Appropriate equipment was used to protect the personal (protective cover-all clothing, gloves, and safety shoes). Body temperature was monitored by sensor chips placed under superficial skin muscle. Pigs were examined daily and monitored for dyspnea, coughing, nasal discharge, conjunctivitis, ear color, diarrhea, activity. They were euthanized on D88 by an overdose of sodium pentothal.

Animal sample collections

Nasal swabs were collected for viral detection in 500 µL RPMI and for antibody detection in PBS + antiprotease cocktail, and they were immediately frozen. For virus detection, nasal swabs were collected on D34, 41, D48 (MLV-FL13b) and on D58, 69, 73, and 83 (FL07). For antibody detection, nasal swabs were collected on D0 and D58. Sera were collected for antibody detection on D0, 34, 48, 58, 88 and for viral detection on D34, 41, 48 (MLV-FL13b) and on D58, 69, 73, 83 (FL07).

Overlapping peptides.

Overlapping peptides (20 mers, offset 8) covering the NSP1b, RdRp, N and the GP4GP5M PRRSV antigens were synthesized by Mimotopes (Mimotopes Pty Ltd, Victoria, Australia , <http://www.mimotopes.com>). Upon receipt, the peptides were diluted in H2O:acetonitril (50:50 vol) at a 5 mg/mL concentration and grouped as pools of peptides not exceeding 50 peptides: pool N (15 peptides), pool GP (GP4GP5M chimera), pool NSP1β1 and 2 pools RdRp1 (peptide 1 to 40), pool RdRp2 (peptide 41 to 80). A 20-mer peptide from the HIV polymerase was used as control.

IFN γ detection by ELISPOTS

PBMCs were collected on D49 on three 8mL Vacutainer® CPT™ (BD Bioscience) by centrifugation at 1800 g for 35 min at 25 °C. PBMCs were washed with PBS + 1.3 mM citrate and re-suspended in X-vivo medium (Ozyme) + 50% FCS + 1.3 mM citrate and rested overnight. PBMCs were resuspended in X-VIVO-20 medium supplemented with 2% FCS, 100 U/ml penicillin and 1 µg/mL streptomycin (culture medium) and counted for live cells. IFN γ -secreting T cells were detected using PVDF membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen®HTS, Millipore) coated with 15 µg/mL anti-porcine IFN γ (capture mAb) in PBS. PBMCs (2 x 10⁵) were plated per well and were stimulated with the different pools of overlapping peptides described above at a 10 µg/mL final concentration for 18 hours, in

triplicates. A HIV polymerase-derived peptide and ConA at 25 µg/mL were used as controls. After 18h, the IFN γ -secreting cells were revealed by sequential incubations with 0.5 µg/mL biotinylated anti-IFN γ followed by 0.5 µg/ml alkaline phosphatase conjugated-streptavidin and 1-StepTM BCIP/NBT reagent. The spots were enumerated using the iSPOT reader from Autoimmun Diagnostica GmbH. Positive wells were considered if the mean spot numbers in the stimulated conditions were significantly superior to the spot numbers in the control peptide conditions ($p < 0.05$, paired t-test) and if > 55 spots. The mean number of spots from stimulated minus control peptide wells was calculated.

Collection of serum and nasal fluid and evaluation of their content in anti-N IgG by ELISA.

The sera and swab extracts prior challenge were assayed using the Ingezim PRRS 2.0 kit (Ingenasa, Spain) at a 1:40 and 1:2 dilution respectively before challenge and at a 1:400 dilution after challenge. The S/P ratio were calculated as follows: [OD sample minus OD negative control]:[OD positive control minus OD negative control], using the mean of the experimental negative controls.

Detection of neutralizing antibodies (NAbs) and anti-envelop proteins

NAbs were quantified in sera on MARC-145 cells against the FL13b vaccine strain according to the Virus Neutralisation Titer (VNT) method described in a previous paper (Charpin, Mahe et al. 2012). Anti-envelop Abs were also detected using the ELISA PrioCHECKTM PRRSV VIA (Prionics) at a 1:20 dilution. This indirect ELISA test (not yet commercially available) has been generated to discriminate between Type I (EU) and Type II (US) PRRSV infection, and is proposed for the detection of NAbs. S/P ratios were calculated as recommended by the manufacturer.

Viral detection by specific qRT-PCR

For quantification of viral RNA copies in sera and nasal swab, viral RNA was first extracted from 100 µL biological fluid using NucleoSpin[®] RNA Virus kit from Nagel-Macherey. A one-step qRT-PCR was performed using the iTaqTM universal probes One-Step kit (Bio-rad). Primers were designed to amplify selectively FL07 and not FL13 sequences, in the ORF1 gene: forward primer 5'-TGGCACAGAATCCGACAACA-3', reverse primer 5'-GTCTAAGGCCTGCGCATCA-3'. A fluorescent probe was designed that hybridizes to the specific FL07 PCR product: FAM 5'-AGCTCGCCTCTGACTT-3' TAMRA. A standard curve was made with four 10-fold dilutions of the FL07 inoculum (10¹ to 10⁴ TCID₅₀/ml), each spiked in control pig serum and extracted with the NucleoSpin[®] RNA Virus kit. The qRT-PCR was performed with 2 µl of sample elution in 10 µL final mix and the cycling

involved the following steps: reverse transcription at 50 °C for 10 min, denaturation at 95 °C for 3 min, amplification 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s. TaqMan run of experimental samples contained 2 replicates, mock pig serum RNA and H₂O. The reactions were carried out in a CFX Connect™ light cycler (Bio-Rad). The number of viral RNA copies/ml in each sample was determined using the FL07 RNA standard calibration curve. For each animal, the area under the curve (AUC) of the viral RNA copies per ml over 25 days (viral RNA AUC) was calculated. For MLV-FL13b detection, the same protocol was used with specific primers: forward primer 5'- TGTTTCCCCACAGATGTTTCG - 3', reverse primer 5'- CCAGGATTTTGAGGCTTTTCC -3' and fluorescent probe FAM 5'- CCCCAGATCAGTATC -3' TAMRA. The FL13 RNA standard curve was made with 10-fold dilutions from 10¹ to 10⁵ TCID₅₀/mL). The specificity of the qPCR reactions for FL07 and FL13 detection was checked on the respective standard curves and strictly no heterologous virus could be detected.

Statistical and correlation analysis.

Data were analyzed with the GraphPad Prism 7.0 software. The unpaired non-parametric two-way Mann-Whitney test was used to compare the inflammatory cytokine results, the luciferase, the Elispot and Ab results between 2 groups. The principal component analysis was done with 16 factors and included the individual viral RNA copies/ml at D69, 73 and 83 as well as the viral RNA AUC, the individual body temperatures at D65, the T cell responses at D49 to the N, GP4GP5M, NSP1β, RdRp1 and RdRp2 pools, the total number of spots per pig (with and without the NSP1β responses), the number of T cell antigens recognized per pig, the anti-N Ab at D58 and 83 and the anti-envelop Ab at D58 and D88. PCA graphics has been produced using the FactoMineR R package (<http://factominer.free.fr/>). The correlation analysis between the different immune and virological parameters was done with a bilateral Spearman non-parametric test.

Results

Transduction efficacy of pig skin cells upon DNA delivery with a needle-free high pressure jet injection (Pharmajet® Tropis-ID device, PJ) versus surface EP.

In order to deliver our DNA vaccines in a convenient, well-tolerated and efficient manner, we compared the transduction efficacy of pig skin cells with a pLuc plasmid administered as plain DNA via needle-free high pressure jet injection (PJ) versus surface EP. Indeed, we previously showed that the later led to high luciferase expression in pig skin and good immunogenicity with plasmids encoding untargeted PRRSV-AG (**Bernelin et al, article 2**). Skin biopsies were harvested 24 hours after pLuc delivery and processed for detection of luciferase expression by bioluminescence measurement. **Figure 1A** shows that PJ delivery induced luciferase expression reaching higher values ($2.69 \times 10^9 \pm 1.57 \times 10^9$ p/s/cm²/sr) than surface EP delivery ($1.30 \times 10^8 \pm 1.46 \times 10^7$, $p < 0.005$). As detailed in the Material and Methods and on **Figure 1A**, pLuc was administered with PJ either in the costal zone or in the ischium zones, what gave similar transfection efficacy (**Figure 1A**).

In addition, we evaluated the in situ expression of a pmCherry plasmid, 24 hours post-delivery with PJ and EP, using a whole tissue clearing strategy and detection with 2-photon microscopy. **Figure 2** shows that keratinocytes (A, B), dermal cells resembling fibroblasts and possibly DCs (C, D) and cells resembling adipocytes (E, F) expressed the mCherry protein upon in vivo transfection. No clear difference in the micro-anatomy of mCherry expression could be seen between EP and PJ delivery from three skin samples.

Skin biopsies were placed in flotation in culture medium for 24 hours. The cytokine content was analyzed in a multiplex assay for detection of IL-4, IFN α , TNF α , IL-2, IL-8, IL-13, IL-12, IL-6, IFN γ , IL-10, IL-17, IL-1 β . The DNA administration with PJ induced variable and low levels of IL-1 β and IL-8 (no statistical significance versus control skin of the same site) whereas EP, as we published before (**Bernelin et al, article 2**), induced significant amounts of both cytokines (**Figure 1B**). The other cytokines were not detected with our assay.

Altogether, PJ appears more potent than EP to transduce skin cells and induces lower inflammatory responses than EP.

IFN γ T cell responses induced by a prime-boost DNA-MLV-FL13b strategy with DNA encoding PRRSV-AG targeted or not to XCR1 and delivered with EP or PJ.

We previously showed that an improvement of the T cell response breadth was achieved by a DNA-MLV prime-boost strategy, versus DNA-only or MLV-only (**Bernelin et al, article 3**). We selected DNA plasmids from the ones which were used in that study (see Material and

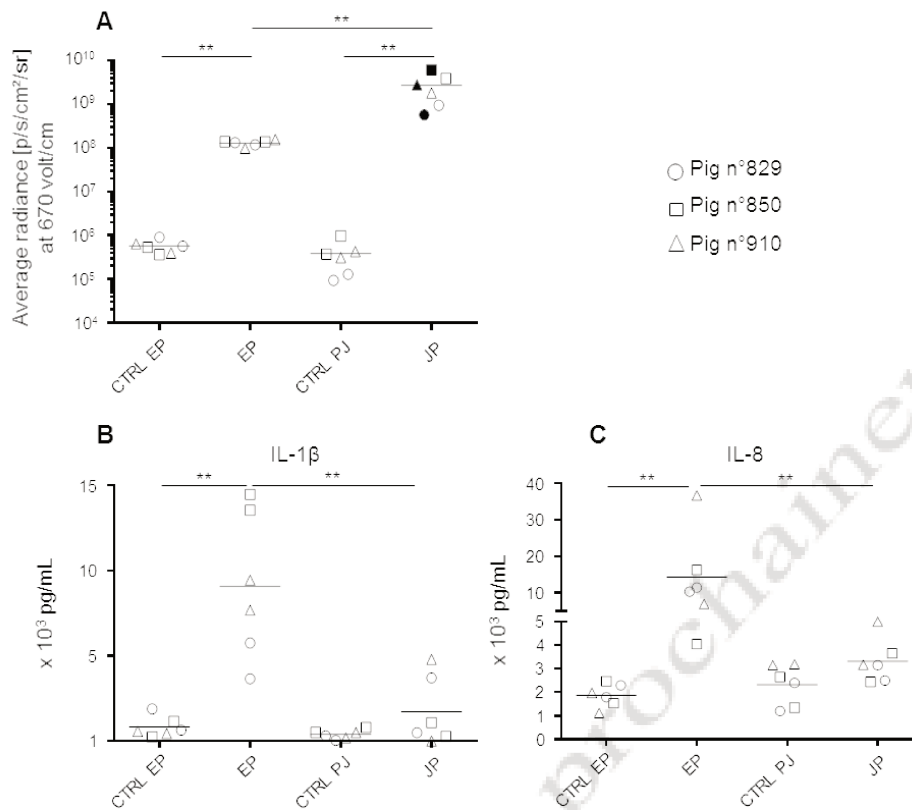


Figure 1. Expression of luciferase activity and cytokine secretion upon in vivo transfection of pig skin cells with pLuc delivered using surface EP and PJ. Three Large White pigs (3-month-old, number 829, 850 and 910) were anesthetized. In the inguinal zone, 100 μ g pLuc was injected intradermally in 100 μ l saline in duplicates and the skin site was subjected to surface EP as described in the material and methods. In the thoracic and ischium zone (filled and empty symbol respectively), 100 μ g pLuc was administered with PJ in 100 μ l saline in duplicates. After 24 hours, 8 mm biopsies were harvested at the sites of administration. **A.** Biopsies from the transfected sites were processed for luciferase activity detection. Control skin of the same respective sites (inguinal and lower thoracic) were collected and treated in parallel and are designated as CTRL-EP and CTRL-PJ respectively. The luciferase activity results (p/s/cm²/sr) of the transfected and control skin from pig 829, 850 and 910 are indicated by a distinct symbol (circle, square and triangle respectively) and means are shown. **B –C.** Biopsies from the transfected sites were placed in culture medium for 24 hours. Secreted IL-1 β and IL-8 from each pig biopsy (same symbols as in **A**) were measured with a CBA multiplex assay and the mean is shown. Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test, ** = $p < 0.01$.

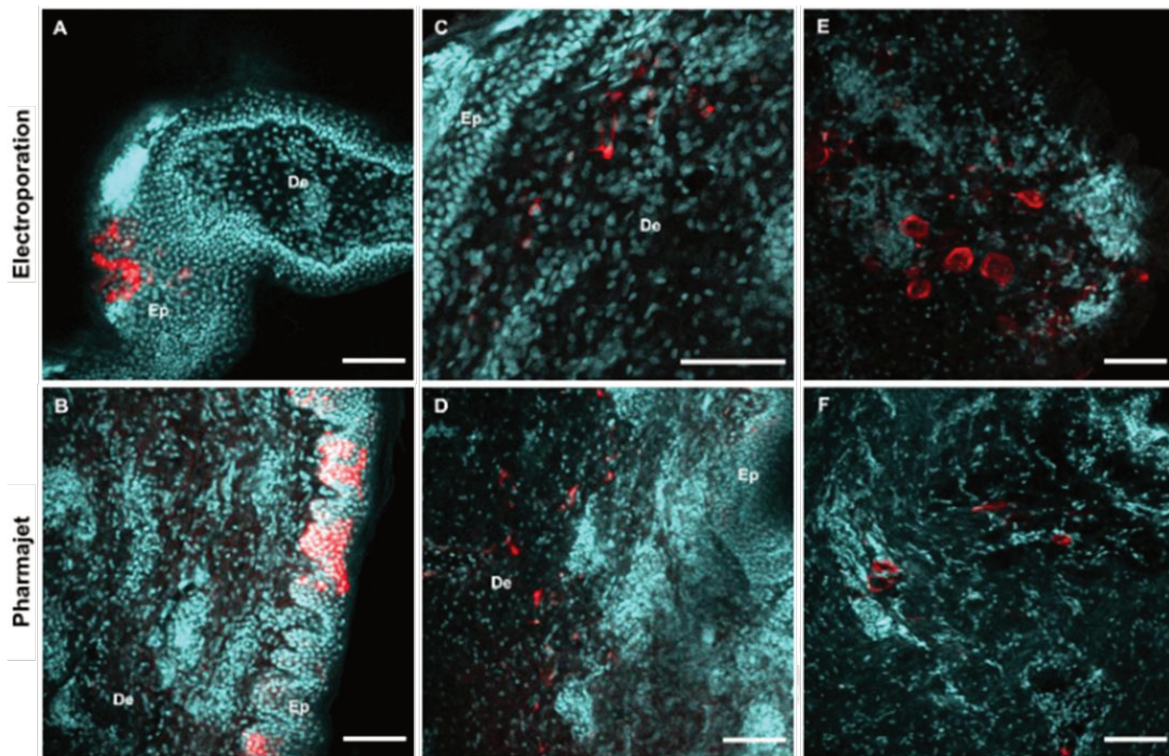


Figure 2. Transfection of skin cells with EP and PJ. Skin biopsies were harvested 24 hours post-administration of 100 μg pmCherry with EP or PJ as described in **Figure 1**, and immunostained in toto using anti-mCherry rabbit IgG and Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG for mCherry detection (red) and DAPI for nucleus visualisation (cyan) before tissue clearing. Representative optical sections were extracted from 2-photon acquisition performed through thickness of the whole sample. **A, C, E.** Expression of mCherry upon EP delivery, in the epidermis (**A**) and dermis (**C**) where cells resemble fibroblasts and **E** where cells resemble adipocytes). **B, D, F.** Expression of mCherry upon PJ delivery, in the epidermis (**B**) and dermis (**D**) where cells resemble fibroblasts and **F** where cells resemble adipocytes). De : Dermis, Ep : Epidermis. Scale bar : 100 μm .

Table 1. Vaccination with DNA vectors, MLV-FL13b and infection with the FL07 heterologous PRRSV strain

Vaccines and dates	Groups		DNA+MLV-FL13b			
	Ctrl1	MLV-FL13b	XCL1-EP	XCL1-PJ	UT-EP	UT-PJ
DNA			pXCL1-N2	pXCL1-N	pN	pN
D0			pXCL1-GP4GP5M	pXCL1-GP4GP5M	pGP4GP5M	pGP4GP5M
			pXCL1-NSP1 β 1	pXCL1-NSP1 β 1	pNSP1 β	pNSP1 β
			pXCL1-NSP1 β 2	pXCL1-NSP1 β 2	pRdRp	pRdRp
			pRdRp	pRdRp		
MLV-FL13b	-	+	+	+	+	+
D34						
FL07 challenge	+	+	+	+	+	+
D63						

1 non-vaccinated group, 2 plasmids per pig inoculated at D0

Method section). These plasmids encode PRRSV AG containing T cell epitopes which are conserved through viral strains, i.e. RdRp, NSP1 β and M (Mokhtar, Eck et al. 2014). The M sequence is included in a GP4GP5M chimera previously used on the context of DC-targeting (Subramaniam, Pineyro et al. 2014) and the immunodominant B cell antigen N is also used to probe the antibody response. The PRRSV AG are either targeted to XCR1 via VB platforms using pig XCL1 as a targeting unit (pXCL1-GP4GP5M, pXCL1-N, pXCL1-NSP1 β 1 and pXCL1- NSP1 β 2) or untargeted (UT, pGP4GP5M, pN, pNSP1 β , pRdRp). The PRRSV-AG sequences were derived from the PRRSV European subtype 1 13V091 strain (FL13, (Frydas, Trus et al. 2015)). On day 0 (D0), plasmids encoding targeted or non-targeted PRRSV-AGs were administered either with EP or PJ, according to **Table 1**. At the difference with our previous study, the DNA was not combined to cationic PLGA nanoparticles (see introduction). On D34, the attenuated FL13 MLV strain was administered by the intramuscular route. The IFN γ T cell response to overlapping peptides covering the different vaccine PRRSV-AGs was assayed using the ELISPOT technique from PBMCs collected on D49 (i.e. D15 after the MLV-FL13b boost). The response against RdRp was evaluated with 2 peptide pools (N and C terminal), in order not to exceed 40 peptides per pool and avoid toxicity. The MLV-FL13b and DNA+MLV-FL13b groups showed statistically significant IFN γ T cell response above the unimmunized control group to the N, GP4GP5M and RdRp2 peptide pools (**Figure 3A-E**). Few animals per group presented responses to NSP1 β peptide pools at the difference to in our previous study where the response was higher (Bernelin et al, article 3); the use of cationic PLGA NP (see the discussion) or difference in genetic make-up of the pigs between studies could explain this discrepancy. Higher responses to N and RdRp2 peptide pools were obtained in the PJ group as compared to in the MLV-FL13b group, with no clear benefit of DC-targeting (**Figure 3A-E**). The number of peptide pools recognized per pig was calculated (**Figure 3F**). Whereas 5 out of 9 pig PBMCs responded to at least 2 peptide pools in the MLV-FL13b group, this proportion appears higher in the DNA+MLV-FL13b groups, such as in the XCL1-PJ group (8 out of 9 pigs, **Figure 3F**). However, the increase over the MLV-FL13 group was not statistically significant for any of the DNA-MLV-FL13b group. In conclusion of this experiment using plain DNA administered with surface EP or PJ, the T cell response was only slightly improved by the DNA-MLV prime-boost strategy over the MLV-FL13b alone.

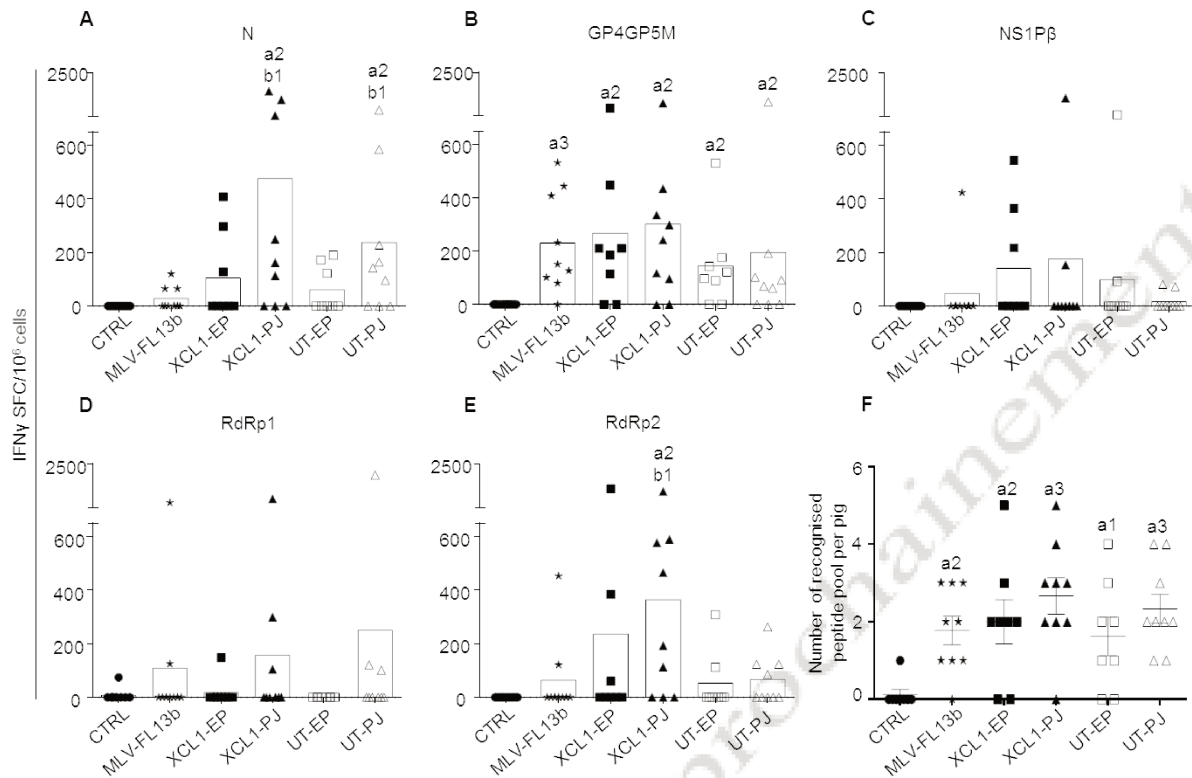


Figure 3. IFN γ T cell responses induced by MLV-FL13b and DNA+MLV-FL13b

PBMCs were collected on D49 and they were analyzed for IFN γ T cell response upon restimulation with overlapping peptide pools (10 μ g/ml) in ELISPOT assays. A-E. The responses to the N, GP4GP5M, NSP1 β , RdRp1 (peptide 1 to 40) and RdRp2 (peptide 41 to 80) peptide pools are shown. An irrelevant peptide (10 μ g/ml) was used as control. The mean number of spots from triplicates of stimulated minus control wells are shown (see Material and Methods). The mean number of spots across pigs per group is shown as a box. The plasmids used to immunize each group are listed Table 1. F. The number of recognised peptide pool per pig is reported (mean \pm sem). Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test. The letter a indicates significant differences with the non-vaccinated control group, and b with the MLV-only group. Number 1 corresponds to $p < 0.05$, 2 to $p < 0.01$, 3 to $p < 0.005$.

Antibody responses induced by the prime-boost DNA-MLV-FL13b strategy.

The anti-N IgG response in the sera was measured using a commercial ELISA kit (Biernacka, Podgorska et al. 2018). The anti-N IgG response was already detected at the time of MLV injection, showing that a single DNA administration with EP and PJ is efficient at inducing anti-N responses. As previously found in **Bernelin et al article 3**, the anti-N IgG response was clearly enhanced in the DNA+MLV-FL13b groups as compared to in the MLV-FL13b-only (**Figure 4, $p < 0.005$**). A higher proportion of pigs presented S/P ratios over 10 in the XCL1 groups than in the UT groups indicating that the XCR1-targeting of N is beneficial to the anti-N IgG response (**Figure 4, D48 and D58**). Sera collected at D58 were assayed for NAbs detection using a classical in vitro neutralization assay with MARC145 cells and FL13b virus as well as a prototype indirect PrioCHECK™ PRRSV-VIA ELISA developed by Prionics, designed to detect NAbs of type 1 PRRSV strains. None of the sera demonstrated neutralizing activity in our assay with MARC145 cells. However, as shown **Figure 5**, all DNA-MLV groups presented higher titers in the Priocheck-VIA assay than the MLV-only group ($p < 0.05$). The discrepancy between the in vitro assay with MARC145 and the Priocheck-VIA assay can be explained by the higher sensitivity of the ELISA test. Notably the ELISA titers were heterogeneous between pigs, possibly due to genetic differences in the antibody repertoires between pigs. This finding indicates that the DNA priming favors the generation of antibodies directed to antigenic determinants of the Type 1 MLV envelop.

Protection induced by the prime-boost DNA-MLV-FL13b strategy against a heterologous challenge with FL07.

So far, the increase of the immune responses induced by the DNA-MLV-FL13b strategy over the MLV-FL13b-induced response reflects immuno-potentiating properties, which might be beneficial to cross-protection against a heterologous Type 1 PRRSV strain. FL13 shows a high genetic diversity to all, currently, publicly available complete genomes of genotype 1 viruses and has been located “alone” in the phylogenetic tree, in a distinct branch from the Flanders' 07V063 strain (FL07) (Frydas, Trus et al. 2015). The mean amino-acid conservation between the variable GP2, GP3, GP4, GP5 between FL07 and FL13 is 84.9 %, which is the usual variation used to assess heterologous protection (Savard, Alvarez et al. 2016). Pigs were challenged intranasally with FL07 on D63. The body temperature was monitored with

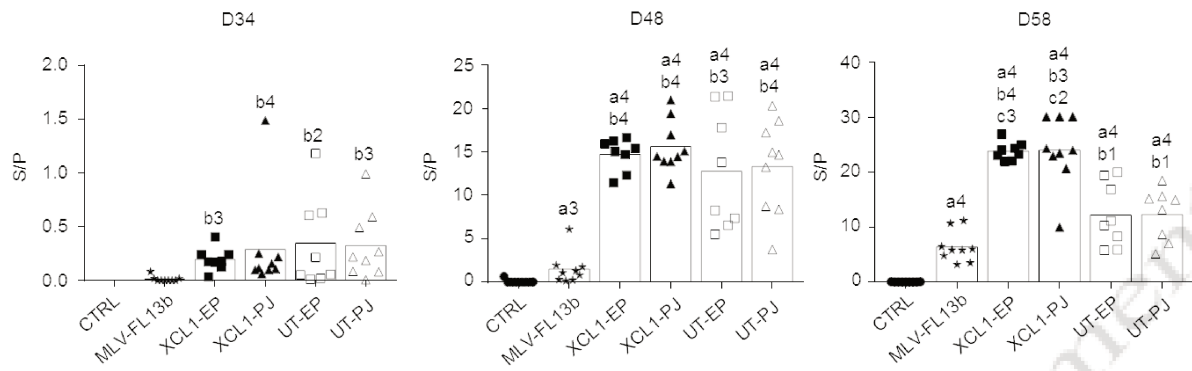


Figure 4. Anti-N IgG responses induced by MLV-FL13b and DNA+MLV-FL13b. Sera were collected on the indicated days and analyzed at a 1:40 dilution for anti-N IgG detection with the Ingezim PRRS 2.0 kit. The S/P ratios are reported and mean (box) \pm sem is shown per group. Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test. The letter a indicates significant differences with the non-vaccinated group, b with the MLV-only group, c with the respective UT group. Number 1 corresponds to $p < 0.05$, 2 to $p < 0.01$, 3 to $p < 0.005$, 4 to 0.001.

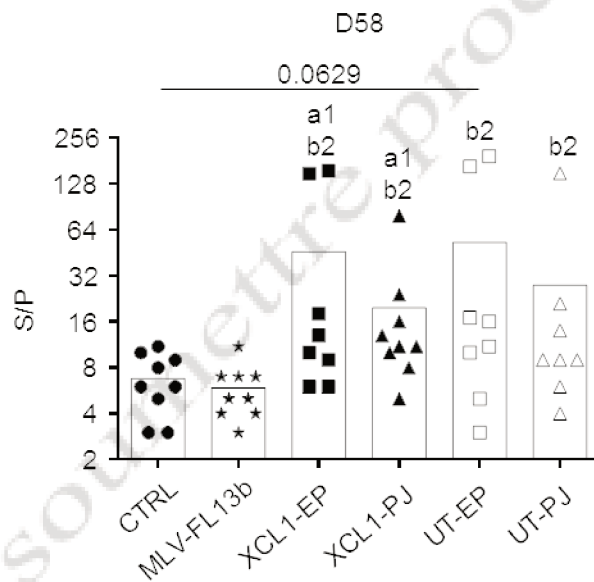


Figure 5. Priocheck-VIA Abs induced by MLV-FL13b and DNA+MLV-FL13b. Sera collected at D58 were analysed at a 1:20 dilution with the Priocheck-VIA kit, designed to detect NAbs. Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test. The letter a indicates significant differences with the non-vaccinated group, b with the MLV-only group. Number 1 corresponds to $p < 0.05$, 2 to $p < 0.01$. The p value is indicated when close to significance.

subcutaneous sensors. A slight rise in temperature from 38.3 ± 0.3 to 39.4 ± 0.4 (mean \pm sem) was measured on D65 in the control non-vaccinated group and this rise was delayed to D66 in the MLV group, to 39.4 ± 0.6 (**Supplementary Figure 1**). The rise was lower in the DNA-MLV-FL13b groups, and especially in the PJ groups ($p < 0.05$, **Supplementary Figure 1G**). The pigs did not present any pathological symptoms upon daily monitoring. FL07 RNA was measured on D58, 69, 73, 83 in the sera and in the nasal secretions using a specific qRT-PCR assay which was checked to be unable to detect FL13 (**Supplementary Figure 2 and Figure 6**). The area under the curve (AUC) of viral FL07 RNA detection (TCID₅₀ equivalent/ml) over time was calculated for each pig. MLV-FL13b significantly reduced the viral RNA content in serum (860 ± 533) and nasal secretion (74 ± 124) compared to in the serum of non-vaccinated pigs (3938 ± 2614 and 1254 ± 1796 , for serum and nasal secretion respectively). However the DNA-MLV-FL13b regimen did not enhance the protective effect of MLV-FL13b (**Supplementary Figure 2 and Figure 6**). The Priocheck-VIA Ab levels were enhanced by FL07 infection at D88 versus D58 before infection (compare **Figure 5** and **supplementary Figure 3**), indicating that FL07 infection further boosted the Ab response against Type 1 envelop determinants, without differences between vaccinated groups. However effective NAbs against FL13b in classical in vitro neutralization assay were not detected at D71 nor D88, indicating that this FL13 DNA-MLV prime-boost strategy, followed by heterologous challenge FL07 was not efficient at inducing neutralizing nor cross-neutralizing Abs.

Lack of immune correlates of protection induced by the MLV and prime-boost DNA-MLV-FL13b strategies against the heterologous FL07 challenge.

The MLV and DNA+MLV vaccinated pigs demonstrate variability of their B and T cell immune responses and of viral replication and shedding values which could be useful to identify correlates of protection against a heterologous challenge. The different immunological, body temperature at D65 and viral variables were loaded on a principal component analysis (PCA) in order to identify the main axes of the data's variance as well as correlated variables. The Dim 1 axis, which explains 31.32% of the variance, clearly separates the data between the control and the vaccinated groups (**Figure 7A**). The PCA loading of each variable shown in **Figure 7B** reveals that the total IFN γ response contributes most significantly to the Dim 1 axis, whereas the RNA viral data contribute most to the Dim 2 and little to the Dim 1 axis. None of the measured immunological data clearly oppose to the virological data, indicating that IFN γ , anti-N and the measured anti-env Ab responses are not

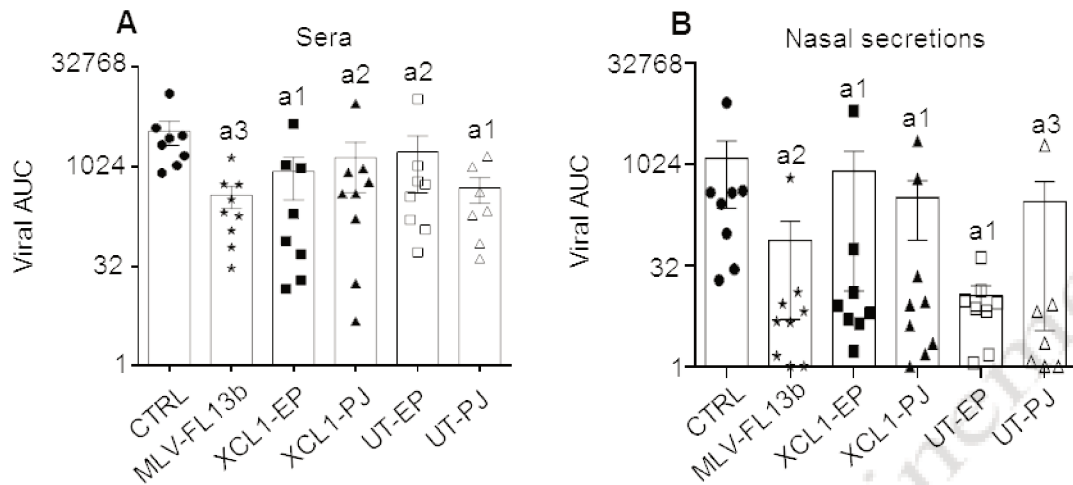


Figure 6. Protection induced by MLV-FL13b and DNA+MLV-FL13b against a FL07 heterologous challenge. The vaccinated pigs were subjected to FL07 challenge on D63 and the FL07 virus was selectively detected in sera and nasal swab fluids with specific qRT-PCR on D58 (before challenge), 69, 73 and 83. TCID₅₀/ml equivalence (TCID₅₀eq/ml) was calculated with a viral standard curve (see Material and Methods). The limit of detection is calculated as being 0.2 TCID₅₀eq/ml. The area under the curve (AUC) for each pig was calculated and the mean (box) ± sem is shown per group.

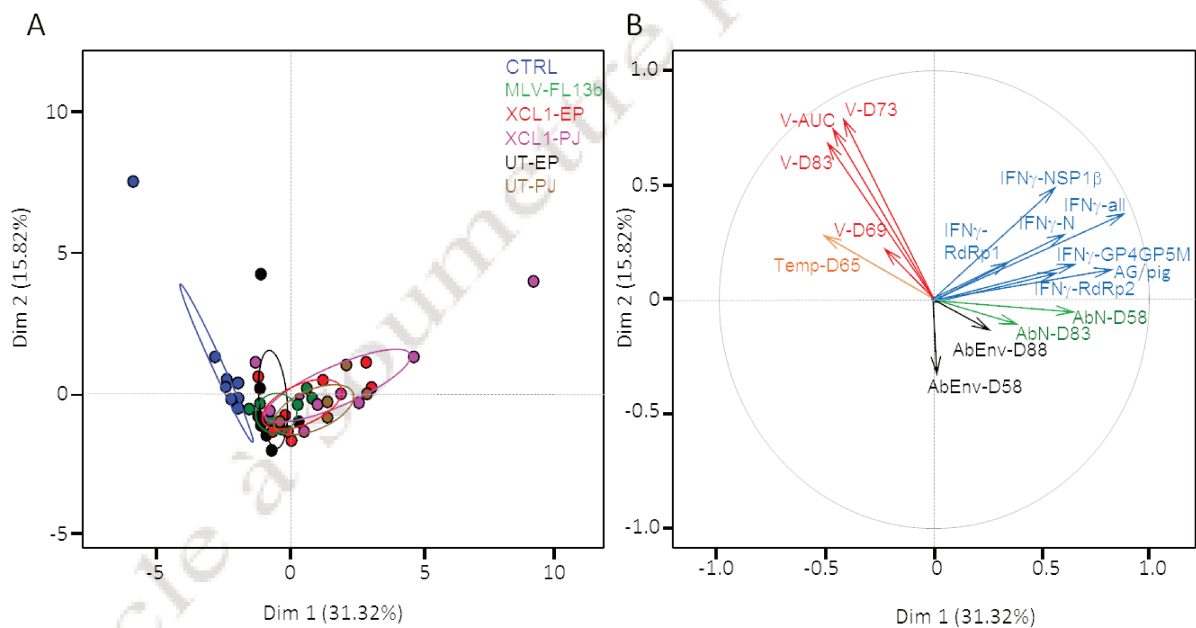


Figure 7. Principal component analysis (PCA) of the experimental variables of the immunisation and the heterologous challenge. The PCA was done with 16 factors and included the individual viral RNA TCID₅₀eq/ml at D69 (V-D69), D73 and D83, the viral RNA AUC (V-AUC), the individual body temperatures at D65 (Temp-D65), the IFN γ T cell responses at D49 to the N (IFN γ -N), GP4GP5M, NSP1 β , RdRp1 and RdRp2 pools, the total number of spots per pig (IFN γ -all), the anti-N Ab at D58 (AbN-D58) and D83 and the anti-envelop Ab at D58 (AbEnv-D58) and D88. Dim 1 is the axis representing the highest percent of the variance and Dim 2 represents the second one.

correlates of heterologous viral protection, what was also confirmed by a Spearman analysis (2 by 2 analyses, not shown). The temperature at D65 data, which contributes moderately to Dim 1, appears to oppose to the IFN γ T cell response data and these variables significantly anti-correlate, although to a low degree (Spearman analysis, $p = 0.01$, $r = -0.35$). The PCA loading of the experimental data of the vaccinated groups (excluding the controls) provided the same conclusions (not shown). Overall the statistics analysis of the experimental data shows that the level of heterologous protection, achieved in the absence of detectable NAbs to the MLV vaccine, is not correlated to the measured immune parameters, i.e. IFN γ , anti-N and anti-env responses.

Discussion

In this work, we show that a DNA-MLV-FL13b prime-boost strategy using plain DNA administered with surface EP and PJ has a slight positive effect on the IFN γ T cell response breadth and enhances the anti-N and envelop IgG response magnitude over the ones induced by MLV-FL13b-only, suggesting that the prime-boost strategy has an immuno-potential effect, especially on the B arm of the response. However, this vaccine strategy did not improve the virological protection against a heterologous distant PRRSV strain over the one induced by MLV-FL13b alone.

In our previous study, the DNA prime promoted more clearly the breadth of the T cell response induced by MLV-FL13b than in this present work. In that previous study, the DNA was combined to cationic PLGA NPs. We hypothesized that the nanoparticles may have enhanced the direct transfection of DCs, and whereby, may have interfered on the DC-targeting of the antigens to XCR1 for promoting the T cell responses. However, this hypothesis was not confirmed, as in this experiment without NPs, we did not observe a clear increase in the T cell response when the PRRSV-AG had been targeted to DCs. Furthermore, the absence of NPs appeared to reduce the benefit of the DNA prime on the IFN γ T cell response, whether the antigens were DC-targeted or not. We propose that NPs combined to DNA has a positive adjuvant effect over naked DNA, as our previous study also indicated (**Bernelin et al, article 2**) and that this adjuvant effect was needed to optimize the T cell response triggered by the DNA-MLV prime-boost strategy. However, the mechanisms of adjuvant effect of NPs remain to be investigated.

Interestingly, naked DNA promoted the B cell response induced by MLV-FL13b, whether the DNA was administered with surface EP or PJ. Importantly, PJ administration was more

efficient than EP to achieve *in vivo* transfection in skin, was less inflammatory, and was as potent as EP to elicit anti-N IgG response (see **Figure 4, D34**). Needle-free jet delivery thus appears as a promising method to deliver DNA vaccines in pigs. Interestingly, the Priocheck VIA Ab response was also enhanced by the prime-boost strategy, indicating that the Ab response to envelop determinants was promoted by the DNA prime. Such priming could have been induced by the GP4GP5M chimera which includes a highly variable linear neutralizing epitope (Vanhee, Costers et al. 2010), or by the different PRRSV constructs through T helper activation. We favor this latter hypothesis as we did not detect a benefit of DC-targeting with the GP4GP5M chimera, whereas it was obtained with the N antigen. However the benefit of DC-targeting on the anti-N IgG response is less potent in the present study than in our previous work where NPs had been combined to DNA and delivered with EP. Again, NPs may have had an adjuvant effect, which has been shown to be necessary to obtain a positive effect of DC-targeting on the antibody and especially on the T cell responses in many instances (Caminschi, Maraskovsky et al. 2012, Neubert, Lehmann et al. 2014). NPs combination to DNA in PJ delivery would need to be evaluated as the limited injection volume of the device may lead to DNA/NP complexes' precipitation and the high-pressure delivery may lead to deformation of NPs. Other adjuvants, less compelling than NPs, should be considered for DNA administration with PJ, either genetic or pharmacologic adjuvants, such as plasmid encoding FLT3 ligand or GM-CSF or resiquimod (Tregoning and Kinnear 2014) or RIG-I agonists produced during the DNA vaccine transcription process (Luke, Simon et al. 2011). This positive effect of the DNA-MLV prime boost on the antibody response could be used for the generation of protective antibody responses, ideally for cross-strain protection. However, epitopes involved in the generation of broadly neutralizing antibodies have not yet been identified, but evidences support their existence (Robinson, Rahe et al. 2018).

Few works have evaluated the advantages of a DNA prime-boost to ameliorate PRRSV vaccination. A DNA-inactivated PRRSV or recombinant adenovirus prime-boost improved the anti-GP5 response in mice (Wang, Zhao et al. 2013, Yu, Qiu et al. 2016) but this approach has not been translated to pigs. The DNA-MLV prime-boost with a plasmid encoding N or truncated N in pigs was shown to correct the negative immunomodulatory properties of a genotype 2 MLV, by reducing the IL-10 and Treg responses generated by MLV administration (Suradhat, Wongyanin et al. 2015). This strategy nevertheless did not improve the viral protection against a heterologous challenge with a highly pathogenic strain (Suradhat, Wongyanin et al. 2015). We were not able to detect IL-10 production in our

restimulation assays with overlapping peptides (not shown), possibly because a type 1 MLV, such as FL13b, was not able to induce an immunomodulatory IL-10 response at the difference with type 2 MLVs (Rahe and Murtaugh 2017).

The priming with our DNA vaccines coding PRRSV-AG appeared to slightly reduce the increase in body temperature detected at D2 post-heterologous challenge (D65) with FL07, especially in the PJ groups. However, the rise in temperature induced by FL07 was very mild (1°C) and clinical symptoms were not detected in our Large White pigs. In the initial description of FL07 by one of us, the pathology of FL07 was also limited (Frydas, Trus et al. 2015). In addition, the TCID₅₀-equivalent copy numbers/ml in blood was lower than the ones in other studies with similar strains (Rose, Renson et al. 2015, Renson, Rose et al. 2017). The relative low viral load may explain the quite substantial protection induced with MLV-FL13b alone which reduced by at least five-fold the overall viremia. The efficacy of PRRSV MLV vaccines also depends greatly on the degree of genetic similarity between the vaccine and challenge strains. A genomic analysis of the ORF2-6 reveals that the amino acid homology between the vaccine FL13b and the challenge FL07 strains was 84.9%, and 88% for GP5, what illustrates that the 2 strains were heterologous. Unfortunately, we were not able to identify the immune parameters associated with this heterologous protection. Either we are missing pertinent parameters, or protection could be controlled by the combination of immune parameters, possibly independently of their magnitude. Finally, as reported by others (Balasch, Fort et al. 2018), we found that heterologous protection can be achieved in absence of detectable functional NAbs. Research efforts are urgently needed to further develop systems' vaccinology tools, in particular functional and refined biochemical antibody assays, to improve the control measures against PRRSV infections and other pig diseases.

Our study reveals that a DNA-MLV prime boost strategy holds promises for the control of PRRSV in pigs and it opens the way to further developments. The delivery with PJ allows a good transfection but minimal inflammation suggesting that it should be combined with complementary adjuvants. The effect of other T cell antigens, such as the conserved NSP5 T cell antigen, should also be evaluated. Finally, although much further down the road, broadly neutralizing epitopes, which appear to exist but remain to be molecularly identified, could be expressed in DNA vaccines associated with a MLV boost including shuffled structural genes (Tian, Cao et al. 2017).

Acknowledgements

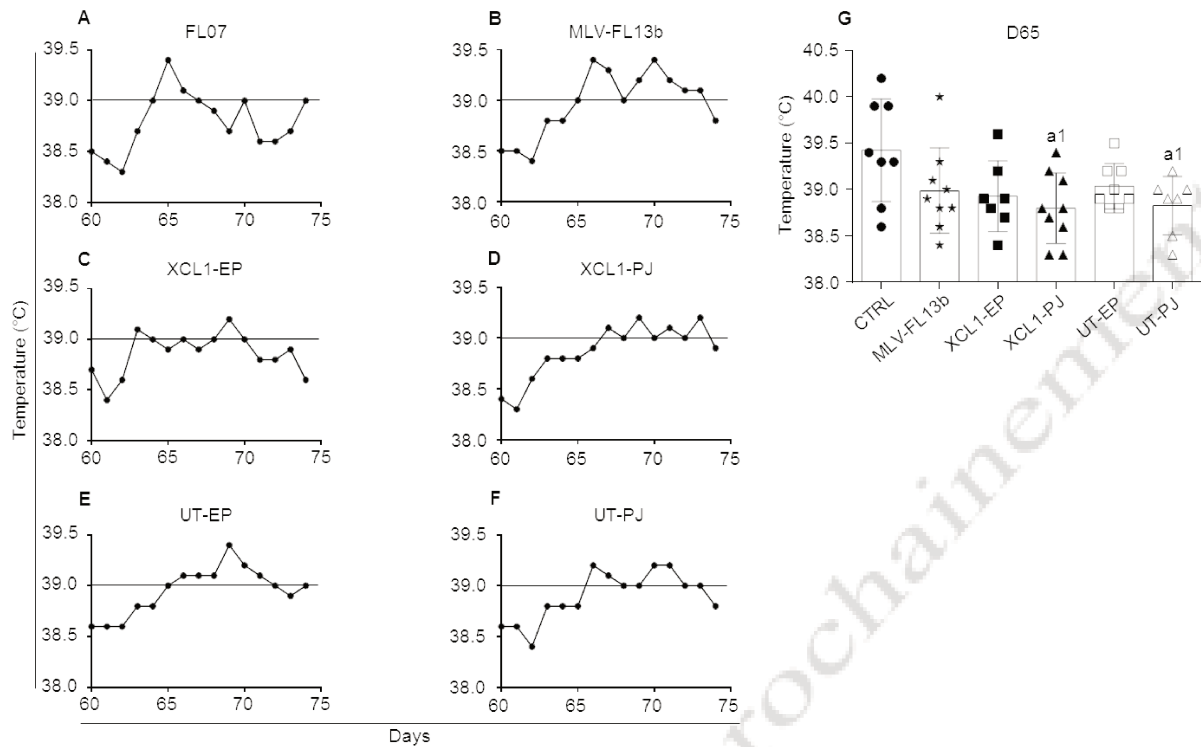
This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Programme for research, technological development and demonstration under the Grant Agreement n°633184. This publication reflects the views only of the author, and not the European Commission (EC). The EC is not liable for any use that may be made of the information contained herein.

We thank the DIM-ASTREA and the Department of Animal Health at INRA for the financial support allowing the purchase of the ispot/fluorospot.

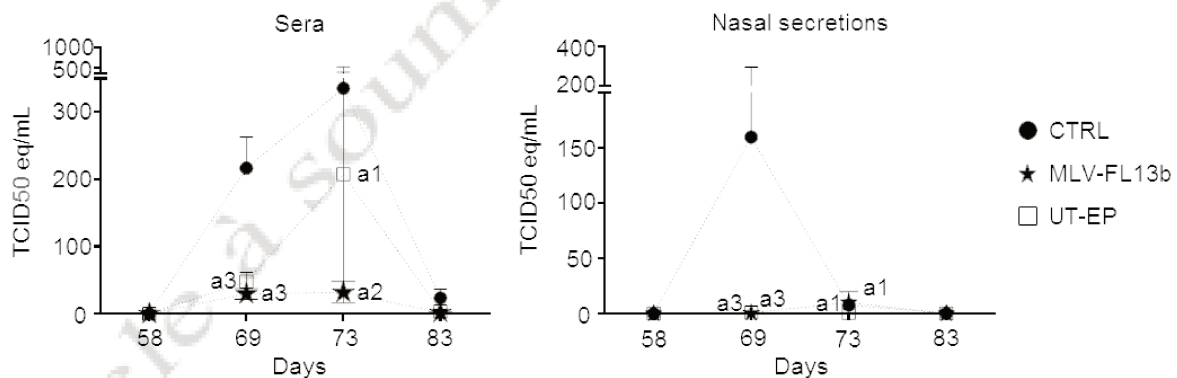
References

- Balasz, M., M. Fort, L. P. Taylor and J. G. Calvert (2018). "Vaccination of 1-day-old pigs with a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live attenuated virus vaccine is able to overcome maternal immunity." *Porcine Health Manag* 4: 25.
- Biernacka, K., K. Podgorska, A. Tyszka and T. Stadejek (2018). "Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum samples." *Res Vet Sci* 121: 40-45.
- Butler, J. E., K. M. Lager, W. Golde, K. S. Faaberg, M. Sinkora, C. Loving and Y. I. Zhang (2014). "Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic." *Immunologic research* 59(1-3): 81-108.
- Caminschi, I., E. Maraskovsky and W. R. Heath (2012). "Targeting Dendritic Cells in vivo for Cancer Therapy." *Front Immunol* 3: 13.
- Charpin, C., S. Mahe, A. Keranflec'h, C. Belloc, R. Cariolet, M. F. Le Potier and N. Rose (2012). "Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent." *Vet Res* 43: 69.
- Crozat, K., S. Tamoutounour, T. P. Vu Manh, E. Fossum, H. Luche, L. Ardouin, M. Guillems, H. Azukizawa, B. Bogen, B. Malissen, S. Henri and M. Dalod (2011). "Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 α + Type." *J Immunol* 187(9): 4411-4415.
- Frydas, I. S., I. Trus, L. K. Kvisgaard, C. Bonckaert, V. R. Reddy, Y. Li, L. E. Larsen and H. J. Nauwynck (2015). "Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates." *Veterinary research* 46(1): 37.
- Grodeland, G., A. B. Fredriksen, G. A. Loset, E. Vikse, L. Fugger and B. Bogen (2016). "Antigen Targeting to Human HLA Class II Molecules Increases Efficacy of DNA Vaccination." *J Immunol* 197(9): 3575-3585.
- Luke, J. M., G. G. Simon, J. Soderholm, J. S. Errett, J. T. August, M. Gale, Jr., C. P. Hodgson and J. A. Williams (2011). "Coexpressed RIG-I agonist enhances humoral immune response to influenza virus DNA vaccine." *J Virol* 85(3): 1370-1383.
- Lunney, J. K., Y. Fang, A. Ladinig, N. Chen, Y. Li, B. Rowland and G. J. Renukaradhya (2016). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System." *Annu Rev Anim Biosci* 4: 129-154.
- Lyoo, Y. S. (2015). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine does not fit in classical vaccinology." *Clin Exp Vaccine Res* 4(2): 159-165.
- Maisonnasse, P., E. Bouguyon, G. Piton, A. Ezquerro, C. Urien, C. Deloizy, M. Bourge, J. J. Leplat, G. Simon, C. Chevalier, S. Vincent-Naulleau, E. Crisci, M. Montoya, I. Schwartz-Cornil and N. Bertho (2016). "The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model." *Mucosal Immunol* 9: 835-849.
- Martelli, P., S. Gozio, L. Ferrari, S. Rosina, E. De Angelis, C. Quintavalla, E. Bottarelli and P. Borghetti (2009). "Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity." *Vaccine* 27(28): 3788-3799.
- Mokhtar, H., M. Eck, S. B. Morgan, S. E. Essler, J. P. Frossard, N. Ruggli and S. P. Graham (2014). "Proteome-wide screening of the European porcine

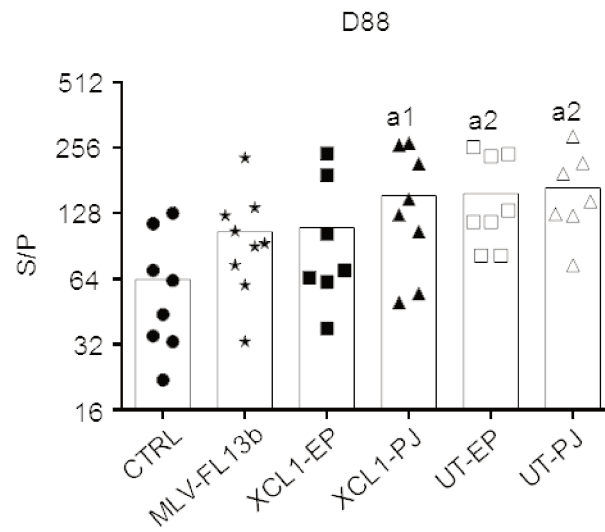
- reproductive and respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity." *Vaccine* 32(50): 6828-6837.
- Neubert, K., C. H. Lehmann, L. Heger, A. Baranska, A. M. Staedtler, V. R. Buchholz, S. Yamazaki, G. F. Heidkamp, N. Eissing, H. Zebroski, M. C. Nussenzweig, F. Nimmerjahn and D. Dudziak (2014). "Antigen delivery to CD11c+CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice in vivo." *J Immunol* 192(12): 5830-5838.
- Rahe, M. C. and M. P. Murtaugh (2017). "Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Viruses* 9(6).
- Renier, N., E. L. Adams, C. Kirst, Z. Wu, R. Azevedo, J. Kohl, A. E. Autry, L. Kadiri, K. Umadevi Venkataraju, Y. Zhou, V. X. Wang, C. Y. Tang, O. Olsen, C. Dulac, P. Osten and M. Tessier-Lavigne (2016). "Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes." *Cell* 165(7): 1789-1802.
- Renson, P., N. Rose, M. Le Dimna, S. Mahe, A. Keranflec'h, F. Paboeuf, C. Belloc, M. F. Le Potier and O. Bourry (2017). "Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain." *Vet Res* 48(1): 15.
- Renukaradhya, G. J., X. J. Meng, J. G. Calvert, M. Roof and K. M. Lager (2015). "Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction." *Vaccine* 33(33): 4069-4080.
- Robinson, S. R., M. C. Rahe, D. K. Gray, K. V. Martins and M. P. Murtaugh (2018). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralizing antibodies provide in vivo cross-protection to PRRSV1 and PRRSV2 viral challenge." *Virus Res*.
- Rose, N., P. Renson, M. Andraud, F. Paboeuf, M. F. Le Potier and O. Bourry (2015). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions." *Vaccine* 33(21): 2493-2499.
- Savard, C., F. Alvarez, C. Provost, Y. Chorfi, S. D'Allaire, M. O. Benoit-Biancamano and C. A. Gagnon (2016). "Efficacy of Foster's PRRS modified live virus vaccine against a Canadian heterologous virulent field strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *Can J Vet Res* 80(1): 1-11.
- Shi, M., T. T. Lam, C. C. Hon, R. K. Hui, K. S. Faaberg, T. Wennblom, M. P. Murtaugh, T. Stadejek and F. C. Leung (2010). "Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective." *Virus Res* 154(1-2): 7-17.
- Subramaniam, S., P. Pineyro, D. Tian, C. Overend, D. M. Yugo, S. R. Matzinger, A. J. Rogers, M. E. Haac, Q. Cao, C. L. Heffron, N. Catanzaro, S. P. Kenney, Y. W. Huang, T. Opriessnig and X. J. Meng (2014). "In vivo targeting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen through porcine DC-SIGN to dendritic cells elicits antigen-specific CD4T cell immunity in pigs." *Vaccine* 32(50): 6768-6775.
- Suradhat, S., P. Wongyanin, S. Kesdangsakonwut, K. Teankum, M. Lumyai, S. Triyarach and R. Thanawongnuwech (2015). "A novel DNA vaccine for reduction of PRRSV-induced negative immunomodulatory effects: A proof of concept." *Vaccine* 33(32): 3997-4003.
- Tian, D., D. Cao, C. Lynn Heffron, D. M. Yugo, A. J. Rogers, C. Overend, S. R. Matzinger, S. Subramaniam, T. Opriessnig, T. LeRoith and X. J. Meng (2017). "Enhancing heterologous protection in pigs vaccinated with chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus containing the full-length sequences of shuffled structural genes of multiple heterologous strains." *Vaccine*.
- Tregoning, J. S. and E. Kinnear (2014). "Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases." *Microbiol Spectr* 2(6).
- Vanhee, M., S. Costers, W. Van Breedam, M. F. Geldhof, J. Van Doorselaere and H. J. Nauwynck (2010). "A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains." *Viral Immunol* 23(4): 403-413.
- Wang, Y., H. Zhao, Z. Ma, Y. Wang and W. H. Feng (2013). "CTLA4 mediated targeting enhances immunogenicity against PRRSV in a DNA prime/killed virus boost strategy." *Vet Immunol Immunopathol* 154(3-4): 121-128.
- Yu, M., Y. Qiu, J. Chen and W. Jiang (2016). "Enhanced humoral and cellular immune responses to PRRS virus GP5 glycoprotein by DNA prime-adenovirus boost vaccination in mice." *Virus Genes* 52(2): 228-234.



Supplementary figure 1. Monitoring of body temperature in pigs challenged with FL07. A-F. The temperature of the vaccinated pigs (one group per panel) was monitored with subcutaneous sensor chips and the mean values from D60 to 75 are reported per group. G. The individual body temperatures are reported for each group at D65 (mean as a box, \pm sem).



Supplementary figure 2. Detection over time of FL07 RNA in serum (A) and nasal secretions (B) of unvaccinated, MLV-13b and ADN+MLV-FL13b vaccinated pigs. The vaccinated pigs were subjected to FL07 challenge on D63 and the FL07 virus was selectively detected in sera and nasal swab fluids with specific qRT-PCR on D58, 69, 73 and 83. The mean values \pm sem of the TCID50eq/ml per pig groups are indicated at each time point. The limit of detection is calculated as being 0.2 TCID50eq/ml. Only 3 groups are represented for clarity, i.e. the control, MLV-13b and UT-EP groups as representative of the ADN+MLV-FL13b vaccinated pigs. Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test. The letter a indicates significant differences with the non-vaccinated control group. Number 1 corresponds to $p < 0.05$, 2 to $p < 0.01$, 3 to $p < 0.005$.



Supplementary figure 3. Effect of the FL07 heterologous challenge on Priocheck-Via Abs in MLV-FL13b and ADN+MLV vaccinated pigs. Sera collected at D88 were analyzed at a 1:20 dilution with the Priocheck-VIA kit, designed to detect NAbs. Statistically significant differences between 2 groups were calculated using the Mann Whitney non-parametric test.

Article à soumettre prochainement

Discussion et perspectives

VI. Discussion et perspectives

Les virus influenza et du PRRS sont en constante évolution génétique avec l'apparition de variants. Ces deux virus induisent de grosses pertes économiques dans les industries porcines. Nous avons cherché à développer des stratégies vaccinales qui induisent des réponses cross-protectrices et qui puissent être efficaces contre des variants viraux. Dans le cas du virus influenza, nous avons cherché à faire un vaccin universel qui induise des réponses anticorps contre deux protéines conservées M2e et HA2, et des réponses T contre NP. Dans le cas du virus du PRRS, nous avons cherché à développer un « T cell vaccine ».

• **Choix du modèle animal**

Dans nos deux études, nous avons testé nos vaccins dans le modèle porcin, hôte naturel des deux virus. Le porc partage des propriétés physiologiques, immunologiques avec l'homme, ainsi que des similitudes structurales de la peau. Il s'agit d'un modèle biomédical idéal pour évaluer l'efficacité des vaccins administrés par la peau. Toutefois, ce modèle présente des limites :

- les outils analytiques (absence de connaissances des isotypes des IgG porcines, moins de réactifs immunologiques disponibles que chez l'homme et la souris)
- le coût financier (achat des animaux, hébergement, conditions réglementaires et éthiques)
- la planification

Dans le cas du projet sur le PRRSV, la planification a été établie en 2014, et elle est soumise à des contraintes de livrables européens stricts dans le cadre du contrat et de l'agence d'évaluation de la recherche REA qui est très exigeante (horizon2020.gouv.fr, site). De plus, la planification des expérimentations animales (dates, nombres d'animaux, loges) a été contrainte par les réservations sur la plate-forme d'expérimentation animale de la PFIE, dès 2015. Cette plateforme est localisée à 200 km de mon laboratoire, ce qui est également contraignant dans la planification. Pour des raisons financières et de respect de réglementation et d'éthique, nous avons donc du limiter le nombre de groupes vaccinés, et nous n'avons pas pu évaluer les effets-doses des vaccins, ni faire de comparaison pour évaluer l'effet des nanoparticules (PLGA NP) dans une même expérimentation (avec et sans), ou encore évaluer l'effet du GM-CSF. Ainsi, en raison des planifications établies en 2014, nous n'avons pas pu

faire d'épreuve virale dans l'**article 3**, ce qui est regrettable. En effet, dans cet article, notre stratégie ADN-MLV prime-boost a conduit à une augmentation et un élargissement des antigènes reconnus par la réponse lymphocytaire T par rapport au MLV ou à l'ADN seul, ce qui nous aurait permis d'évaluer l'effet de cette amélioration de la réponse lymphocytaire T sur la protection contre une épreuve hétérologue. Dans l'**article 4** où l'épreuve virale était prévue, nous n'avons pas obtenu d'effet de notre stratégie sur la réponse lymphocytaire T, ce qui ne nous a pas permis de tester la stratégie « T cell vaccine » sur la protection hétérologue.

Les porcs « Large White » d'origine anglaise ont été introduits en France au XIX^{ème} siècle. Cette race est particulièrement appréciée par les industries porcines par sa facilité d'adaptation, ses bonnes performances de reproduction et la qualité de sa viande. C'est donc un bon modèle d'étude. La plupart des animaux dans les industries sont le résultat de croisements entre les Large White, les Landrace français et le Piétrain (<http://www.la-viande.fr/animal-elevage/porc/races-porcines>). Cette diversité pourrait expliquer les réponses variables obtenues dans nos études, notamment après le challenge par la souche Flanders 07. Nous n'avons pas obtenus de symptômes, comme notre collègue hollandais. Alors que des porcs de race belge ont induit des symptômes avec cette même souche (**Frydas et al. 2015**). Enfin, les variations entre les individus d'une même race peuvent dépendre de leur génétique et de leurs précédentes expériences immunes.

- **Choix des souches d'études**

La souche H1N1 pandémique 2009 a été choisie dans le programme ANR « DCskinVacFlu », en collaboration avec le Mexique, car elle venait d'émerger. Ce virus d'origine porcine a émergé au Mexique et aux États-Unis avant de se propager à travers le monde et de provoquer une pandémie (**Liu et al. 2011**).

La souche Flanders 13 (13V091 ou FL13) est un PRRSV-1 sous-type 1 (**Figure 14**). Elle a été isolée en 2013 (**Trus et al. 2016**). En 2017, nos partenaires belges sont parvenus à adapter cette souche sur les cellules MARC145 et à produire une souche atténuée après 73 passages nommée FL13b. Pour le challenge hétérologue, nous avons choisi la souche Flanders 07 (07V063 ou FL07) un PRRSV-1 sous-type 1 isolé en 2007 (**Figure 14**). L'homologie de séquence des acides aminés des protéines GP2, GP3, GP4, GP5 entre FL13 et FL07 est de 84,5 %. Ce pourcentage d'identité est couramment utilisé pour évaluer la protection hétérologue (**Kroll et al. 2018**).

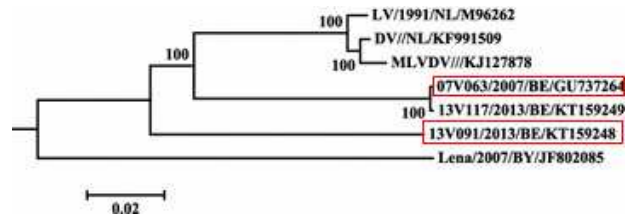


Figure 14 - Arbre phylogénétique de différentes souches du PRRSV-1
Extrait de **Trus et al. 2016**

- **Choix des antigènes candidats (Ag)**

Contrairement aux publications chez la souris sur la grippe, nous n'avons pas obtenu de corrélat entre la protection des porcs et la réponse lymphocytaire T $IFN\gamma$ anti-NP chez le porc (**MacLeod et al. 2013 ; Breathnach et al. 2006**) (**article 1**). Une étude a même montré une exacerbation chez les porcs vaccinés avec des VRP (Virus Replicon Particle) qui expriment la NP (**Ricklin et al. 2017**). NP ne serait donc pas un bon candidat pour une vaccination universelle efficace chez le porc. Toutefois, nous avons montré que la protection des porcs contre le virus était corrélée avec la production d'anticorps anti-HA2 et anti-M2e. Ces deux antigènes sont prometteurs et encourageants pour le développement d'un vaccin influenza universel. Dans notre étude du PRRSV, nous avons montré une efficacité de la stratégie vaccinale des vaccibodies (VB)-XCL1 avec la nucléoprotéine N en prime-boost pour induire des réponses anticorps élevées. Au vu de ces résultats, nous pouvons proposer une stratégie vaccinale chez le porc avec un vaccin à ADN codant VB-XCL1-HA2/M2e suivi d'un rappel de HA2/M2e sous une autre forme vaccinale (prime-boost).

Nos études du PRRSV ont montré que nos stratégies vaccinales et les antigènes candidats choisis étaient assez immunogènes pour induire des réponses lymphocytaires T $IFN\gamma$ détectables chez le porc. Nous avons dû retirer les domaines transmembranaires des antigènes (GP4GP5M) et prendre des antigènes dépourvus de tels domaines (N, NSP1b et RdRp) pour permettre la sécrétion des VB-Ag dans le milieu extracellulaire. Certains antigènes prometteurs n'ont pas été utilisés car leur séquence contient de nombreux domaines transmembranaires. Notamment, nsp5 est une protéine non structurale bien conservée entre les PRRSV-1 sous types 1 et 3. L'homologie de sa séquence aa est de 88,8 % inter-souches PRRSV-1 et quelques PRRSV-2. (**Mokhtar et al. 2014**). Il s'agit d'un **antigène T immunodominant**, induisant de fortes réponses lymphocytaires T $IFN\gamma$ (**Mokhtar et al. 2016**), elle est composée de nombreuses régions hydrophobes (**Li et al. 2012**). C'est pourquoi,

il serait très intéressant de développer un vaccin à ADN avec nsp5, seul ou en prime-boost avec le MLV.

- **Choix des stratégies d'injection**

Les types cellulaires transfectés après les différentes méthodes d'injection que nous avons employées, avec ou sans PLGA NP, peuvent être différents. Nous pourrions identifier ces types cellulaires par des techniques in-toto en microscopie confocale ou biphotonique. Nous avons essayé d'évaluer in situ, l'expression du plasmide mCherry injecté dans la peau de porc avec le Pharmajet Tropis® ou par électroporation (EP) avec ou sans PLGA NP. Les premiers résultats sont présentés dans la **Figure 15A** et montrent la transfection de cellules du derme. Les analyses sont en cours (**article 4**).

Lors d'expérimentations préliminaires, nous avons appliqué des patches à micro-aiguilles biodégradables (DMN) chargés au rouge Congo, et nous avons observé un transfert de colorant dans la peau de porc (**Figure 15B**). L'analyse des biopsies (8 mm de diamètre) prélevées au niveau des sites d'injection a montré que la transfection du plasmide luciférase injecté après application des DMN est efficace (**article 2**). L'efficacité de transfection des DMN a été aussi montrée chez la souris (**Cole et al. 2018 ; Qiu et al. 2016**). Nous n'avons pas détecté de réponses locales inflammatoires (sécrétion de cytokines ou mobilisations cellulaires) après application des DMN avec ou sans PLGA NP, à la différence des injections par EP. Ces différences de détection pourraient être dues à la dose de plasmide transféré par biopsie. En effet, par biopsie de 0,5 cm², nous avons en théorie 100 µg de plasmides transférés par EP au point d'injection, et seulement 20 µg avec les DMN car l'ADN est réparti sur toute la surface du DMN (9 cm²). Nous pourrions recommencer l'expérience en utilisant 20 µg d'ADN par point d'injection avec EP pour mieux comparer les résultats avec les DMN. Aussi, nous n'avons pas détecté de réponses humorales IgG anti-N ou de faibles réponses lymphocytaires T IFN γ chez les porcs DMN. Des études menées chez la souris ont montré que les DMN sont immunogènes et induisent des réponses humorales et lymphocytaires (**Yin et al. 2013**). Ces résultats indiquent que l'application de DMN nécessite des optimisations chez les grands mammifères. Nous proposons qu'il faille induire des réponses inflammatoires ou adjuvantes pour générer des réponses immunes avec les patches. Nous pourrions tester et comparer l'efficacité de différents types de patches (aiguilles dures, creuses) appliqués sur la peau de porc (cf. partie III.C.2.a.iv.).

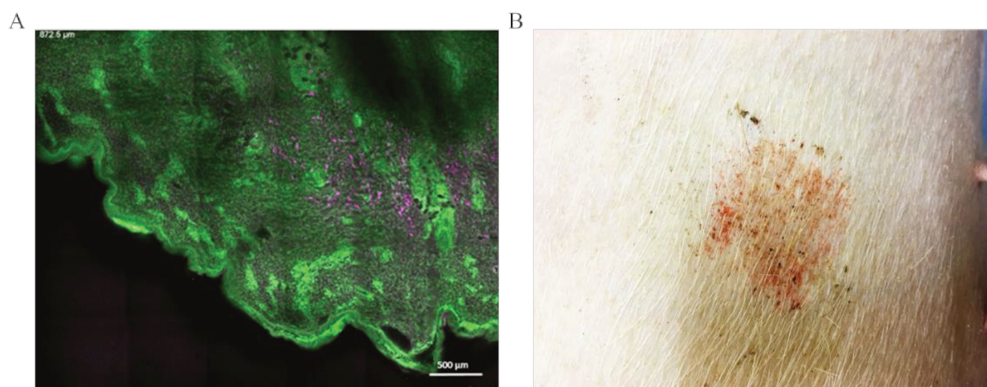


Figure 15 - Photographies in situ et macroscopiques de la peau de porc après électroporation et application des patches à micro-aiguilles

- A. Biopsies de peau de porc transparisées par procédé chimique après électroporation d'un plasmide mCherry (24 heures). Les biopsies ont été immunomarquées (rose mCherry, vert DAPI) puis elles ont été analysées par microscopie par excitation à deux photons (**article 4**).
- B. Observations macroscopiques de la peau de porc après application d'un DMN chargé en rouge Congo.

Nos résultats confirment l'efficacité de l'EP à transférer les plasmides dans les cellules de la peau et à induire les réponses immunes chez les porcs. Bien qu'efficace, l'électroporateur CUY21 ne peut pas être utilisé pour des applications vétérinaires. C'est un appareil trop volumineux nécessitant de l'électricité, il faut endormir les animaux et il est utilisé après une injection par la voie intradermique. Un dispositif plus ergonomique a été développé, le Celectra-3p®, moins invasive avec un plus faible voltage. Il a montré une efficacité pour induire des réponses immunes dans différents modèles animaux (**Amante et al. 2015, livre**).

Durant ma thèse, nous avons décidé de tester le système Pharmajet Tropis® (PJ) qui fut publié chez le porc après le début de ma thèse, expliquant que nous ne l'avons pas utilisé dans l'**article 2** (cf. partie III.C.2.b.iii.). Nous avons démontré que l'efficacité de transfection des cellules dépasse celle de l'EP, accompagné d'une réponse inflammatoire modérée au niveau du site d'injection. Toutefois, cette réponse inflammatoire est probablement suffisante pour induire des réponses immunes détectables équivalentes à celle obtenues par l'EP (**article 4**). C'est une méthode prometteuse, en essai clinique chez l'homme mais qui nécessite d'être adaptée pour une application vétérinaire avec un système de réservoir comme le système IDAL® (**Temple et al. 2017**).

- **Les formulations PLGA NP**

Nous avons décidé de retirer les PLGA NP entre les travaux présentés dans les **articles 3 et 4** pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces formulations nécessitent de procéder au mélange ADN et PLGA NP 30 min avant leur utilisation, ce qui n'est pas pratique. De plus, leur emploi compliquerait beaucoup les processus de fabrication, de contrôle qualité, d'enregistrement, et ajouterait un coût substantiel. Dans les travaux de l'**article 3**, nous n'avions pas observé de bénéfice de l'APC-targeting pour améliorer la réponse lymphocytaire T IFN γ et nous avons alors émis l'hypothèse que les PLGA NP pouvaient masquer l'effet du ciblage. Cependant, comme le montre l'**article 4**, cette hypothèse n'est pas vérifiée puisque nous n'avons pas observé de bénéfice de l'APC-targeting sans PLGA NP. De plus, et de façon bien regrettable, le bénéfice du prime-boost ADN-MLV sur la réponse lymphocytaire T n'est plus observé en l'absence de PLGA NP. Il semblerait donc que les PLGA NP ont apporté un bénéfice pour « primer » la réponse lymphocytaire T. De plus, dans l'**article 4**, nous avons aussi décidé d'utiliser le PJ. Nous ne connaissons pas l'effet que peut avoir la pression d'injection du PJ sur les PLGA NP et le petit volume d'injection nécessite de concentrer l'ADN, pouvant conduire à des précipitations des PLGA NP, et ce fut déconseillé par nos partenaires suisses, qui fournissaient les PLGA NP dans le projet. Pour pouvoir les utiliser, il serait nécessaire de retravailler la chimie de la formulation PLGA NP et les rendre stables. Nous avons également observé lors des tests préliminaires que EP+PLGA NP n'améliore pas l'efficacité de transfection des cellules mais réduit le pourcentage de cDC et de LC mobilisées sur le site d'injection par rapport à EP seul (**article 2**). Nous avons alors émis l'hypothèse que les PLGA NP accéléreraient la migration de ces cellules vers les ganglions lymphatiques, suggérant un effet adjuvant.

- **Choix de l'utilisation des adjuvants**

Nous avons utilisé l'adjuvant CpG dans la vaccination protéique influenza par voie intradermique, et nous avons montré que dans la stratégie de l'APC-targeting, il n'apportait pas d'avantages nets à l'induction de réponses immunes chez le porc. Dans des travaux antérieurs, mon équipe a montré que l'utilisation d'adjuvant de type huileux comme le squalène pouvait empêcher le ciblage des DC chez le porc (**Deloizy et al. 2017**), c'est pourquoi ce type d'adjuvant, possiblement plus efficace, n'a pas pu être utilisé. D'autres adjuvants pourraient être testés tels que PAM(3)Cys (ligand de TLR1/2) ou R848 (ligand de

TLR7), ou des combinaisons. Toujours en raison des coûts importants expérimentaux, nous n'avons pas pu tester le CpG par voie intra-musculaire, voie qui a montré son intérêt avec le DC-targeting sur la réponse lymphocytaire T dans l'**article 1**.

Nous avons utilisé l'adjuvant génique pGM-CSF connu comme étant un adjuvant efficace en vaccination à ADN chez le porc. Toutefois, comme décrit dans l'introduction (cf. partie III.D.3.), le GM-CSF peut avoir des effets divers et imprédictibles lors d'immunisation (en fonction de la dose notamment). Nous avons décidé de le retirer entre les travaux des **articles 2 et 3-4** afin d'éviter les possibles interférences avec nos résultats. Toutefois, si d'autres expériences étaient possibles, nous pourrions proposer d'évaluer l'effet de l'APC-targeting sans ou avec des adjuvants géniques comme le pGM-CSF, le FLT3L ou le CD40L chez le porc.

- **Choix du ciblage des APC ou des DC**

La communauté internationale s'intéresse à la stratégie de l'APC-targeting en vaccination mais il existe une importante différence de nombre de publications selon les virus étudiés. Ainsi, on compte une cinquantaine d'études qui ont exploré l'efficacité du ciblage des APC ou des DC contre les virus influenza et elles ont montré l'augmentation des réponses lymphocytaires T CD4^{pos} et CD8^{pos} spécifiques et lymphocytaires B, particulièrement contre la protéine HA, principalement chez la souris. Par contre, seulement trois publications ont été publiées contre le PRRSV. Une étude cible le récepteur CD169, exprimé par certains macrophages (cf. partie III.A.3.a.) et montre un bénéfice mineur du ciblage des APC sur l'élimination virale (**Ooms et al. 2013**). Une autre étude a montré que le ciblage du récepteur DC-SIGN avec l'adjuvant MPLA (ligand de TLR4) en vaccination protéique et avec la chimère GP4GP5M peut augmenter les réponses lymphocytaires T CD4^{pos} spécifiques, ce travail ayant servi de base à notre approche (**Subramaniam et al. 2014**). Ensuite, la même équipe, en utilisant les mêmes molécules ciblées mais avec un autre adjuvant (Poly-IC) n'a pas reproduit les résultats, suggérant l'importance de l'adjuvant utilisé (**Subramaniam et al. 2017**). Nous avons cherché à induire et étendre les réponses lymphocytaires T par la stratégie du DC-targeting en vaccination à ADN, mais cette stratégie n'a pas fonctionné à cet effet. Par contre, nous avons obtenu dans deux expériences différentes (avec et sans les PLGA NP, avec EP et PJ), une accélération et une augmentation de la réponse humorale IgG anti-N en prime-boost par rapport au vaccin atténué seul (**article 3 et 4**). Comme décrit précédemment (cf.

partie III.D.2.), il semble difficile d'induire et/ou d'augmenter la réponse lymphocytaire T chez les grands mammifères avec la stratégie de l'APC-targeting, bien qu'il y a des réussites notamment dans notre stratégie vaccinale contre influenza (**article 1**), chez les veaux (**Njongmeta et al. 2012**) ou encore chez les moutons (**Chrun et al. 2018**). Nos résultats sont prometteurs pour développer un vaccin à ADN efficace chez les porcs mais notre stratégie nécessite des optimisations comme l'ajout d'adjuvant. L'effet adjuvant intrinsèque des systèmes EP et PJ ne sont probablement pas suffisants pour induire des réponses lymphocytaires T fortes.

- **Absence de corrélats de protection contre le PRRSV**

Nous avons pu identifier des corrélats de protection contre le virus influenza mais pas dans le cas du PRRSV. Toutefois, les paramètres immunologiques que nous avons mesurés restent limités. Nous avons tenté de les étendre au cours des expérimentations. Ainsi nous avons restimulé les PBMCs des porcs avec des peptides chevauchants correspondants aux antigènes vaccinaux en milieu de culture. Nous avons ensuite cherché à doser en multiplex les différentes cytokines produites (IL-4, IFN α , TNF α , IL-2, IL-8, IL-13, IL-12, IL-6, IFN γ , IL-10, IL-17 et IL-1b). Nous avons également essayé de détecter la production intracellulaire d'IFN γ pour identifier la contribution des cellules CD4^{pos} et CD8^{pos} à la réponse lymphocytaire. Dans les deux cas, nous n'avons pas réussi. De plus, nous n'avons pas réussi à mettre au point la détection de la translocation de CD107a pour tester l'activité CTL. Enfin, nos partenaires de l'ANSES de Ploufragan (laboratoire de référence du PRRSV) ont réalisé les analyses de séroneutralisations de nos échantillons de l'**article 4** (ceux de l'**article 3** sont en cours), mais ils n'ont pas réussi à détecter d'anticorps neutralisants, peut-être aussi parce que ce test n'est pas sensible, et ne permet pas de rendre compte de la neutralisation in vivo. Toutefois, d'autres activités biologiques pourraient participer à la protection hétérologue partielle que nous avons obtenue dans l'**article 4**, telles que l'activation du complément par les anticorps, l'ADCC ou bien l'ADCP (Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis). Pour ces dernières, des articles indiquent que les protéines du PRRSV ne sont pas détectables à la surface des cellules infectées, rendant l'ADCC/ADCP peu probables, mais il faudrait vérifier cette considération. Tous ces tests biologiques nécessiteront des mises au point importantes et le développement d'outils.

Bibliographie

VII. Bibliographie

- Aguiar, J. C., R. C. Hedstrom, W. O. Rogers, Y. Charoenvit, Jr JB Sacci, D. E. Lanar, V. F. Majam, R. R. Stout, et S. L. Hoffman. « Enhancement of the Immune Response in Rabbits to a Malaria DNA Vaccine by Immunization with a Needle-Free Jet Device. » *Vaccine* 20, n° 1-2 (octobre 2001): 275-80.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00273-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00273-0).
- Ahlén, Gustaf, Jonas Söderholm, Torunn Tjelle, Rune Kjekén, Lars Frelin, Urban Höglund, Pontus Blomberg, Michael Fons, Iacob Mathiesen, et Matti Sällberg. « In Vivo Electroporation Enhances the Immunogenicity of Hepatitis C Virus Nonstructural 3/4A DNA by Increased Local DNA Uptake, Protein Expression, Inflammation, and Infiltration of CD3+ T Cells ». *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 179, n° 7 (1 octobre 2007): 4741-53.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4741>
- Alvarez, B., T. Poderoso, F. Alonso, A. Ezquerro, J. Domínguez, et C. Revilla. « Antigen Targeting to APC: From Mice to Veterinary Species ». *Developmental and Comparative Immunology* 41, n° 2 (octobre 2013): 153-63.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.021>.
- Amante, Dinah H., Trevor R.F. Smith, Janess M. Mendoza, Katherine Schultheis, Jay R. McCoy, Amir S. Khan, Niranjani Y. Sardesai, et Kate E. Broderick. « Skin Transfection Patterns and Expression Kinetics of Electroporation-Enhanced Plasmid Delivery Using the CELLECTRA-3P, a Portable Next-Generation Dermal Electroporation Device ». *Human Gene Therapy Methods* 26, n° 4 (29 juillet 2015): 134-46.
<https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.020>.
- Andrianov, Alexander K., Daniel P. DeCollibus, Helice A. Gillis, Henry H. Kha, Alexander Marin, Mark R. Prausnitz, Lorne A. Babiuk, Hugh Townsend, et George Mutwiri. « Poly[Di(Carboxylatophenoxy)Phosphazene] Is a Potent Adjuvant for Intradermal Immunization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, n° 45 (10 novembre 2009): 18936-41.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908842106>.
- Ansari, Israrul H., Byungjoon Kwon, Fernando A. Osorio, et Asit K. Pattnaik. « Influence of N-Linked Glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 on Virus Infectivity, Antigenicity, and Ability To Induce Neutralizing Antibodies ». *Journal of Virology* 80, n° 8 (15 avril 2006): 3994-4004.
<https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3994-4004.2006>.
- Arapostathis, Konstantinos Nikolaos, Nikolaos Nestoras Dabarakis, Trilby Coolidge, Anastasios Tsirlis, et Nikolaos Kotsanos. « Comparison of Acceptance, Preference, and Efficacy between Jet Injection INJEX and Local Infiltration Anesthesia in 6 to 11 Year Old Dental Patients ». *Anesthesia* Progress 57, n° 1 (2010): 3-12.
<https://doi.org/10.2344/0003-3006-57.1.3>.
- Babiuk, L. A., R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr, et S. van Drunen Littel-van den Hurk. « Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals ». *Vaccine, Vaccines and Immunisation* 2003. Based on the Third World Congress on Vaccines and Immunisation, 21, n° 7 (30 janvier 2003): 649-58.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00574-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00574-1).
- Babiuk, S., M. E. Baca-Estrada, M. Foldvari, M. Storms, D. Rabussay, G. Widera, et L. A. Babiuk. « Electroporation Improves the Efficacy of DNA Vaccines in Large Animals. » *Vaccine* 20, n° 27-28 (septembre 2002): 3399-3408.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00269-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00269-4).
- Bachem, Annabell, Steffen Güttler, Evelyn Hartung, Frédéric Ebstein, Michael Schaefer, Astrid Tannert, Abdulgabar Salama, et al. « Superior Antigen Cross-Presentation and XCR1 Expression Define Human CD11c+CD141+ Cells as Homologues of Mouse CD8+ Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 6 (7 juin 2010): 1273-81.
<https://doi.org/10.1084/jem.20100348>.
- Baranowska, Marta, Anna G. Hauge, Chloé Hoornaert, Bjarne Bogen, et Gunnveig Grødeland. « Targeting of Nucleoprotein to Chemokine Receptors by DNA Vaccination Results in Increased CD8(+)-Mediated Cross Protection against Influenza ». *Vaccine* 33, n° 49 (8 décembre 2015): 6988-96.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.094>.
- Barbon, Christine M., Lisa Baker, Christa Lajoie, Urban Ramstedt, Mary Lynne Hedley, et Thomas M. Luby. « In vivo electroporation enhances the potency of poly-lactide co-glycolide (PLG) plasmid DNA immunization ». *Vaccine* 28, n° 50 (23 novembre 2010): 7852-64.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.078>.
- Baroli, Biancamaria, Maria Grazia Ennas, Felice Loffredo, Michela Isola, Raimondo Pinna, et M. Arturo López-Quintela. « Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin ». *Journal of Investigative Dermatology* 127, n° 7 (1 juillet 2007): 1701-12.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700733>.
- Bastos, R. G., O. A. Dellagostin, R. G. Barletta, A. R. Doster, E. Nelson, F. Zuckermann, et F. A. Osorio. « Immune Response of Pigs Inoculated with Mycobacterium Bovis BCG Expressing a Truncated Form of GP5 and M Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. » *Vaccine* 22, n° 3-4 (janvier 2004): 467-74.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00572-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00572-3).
- Bautista, E. M., et T. W. Molitor. « Cell-Mediated Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine ». *Viral*

Immunology 10, n° 2 (1997): 83-94.
<https://doi.org/10.1089/vim.1997.10.83>.

Bautista, Elida M., Sagar M. Goyal, In J. Yoon, Han S. Joo, et James E. Collins. « Comparison of Porcine Alveolar Macrophages and CL 2621 for the Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus and Anti-PRRS Antibody ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, n° 2 (1 avril 1993): 163-65.
<https://doi.org/10.1177/104063879300500204>.

Beran, Jiri, Arvydas Ambrozaitis, Alvydas Laiskonis, Narseta Mickuviene, Patrick Bacart, Yvan Calozet, Etienne Demanet, et al. « Intradermal influenza vaccination of healthy adults using a new microinjection system: a 3-year randomised controlled safety and immunogenicity trial ». *BMC Medicine* 7, n° 1 (2 avril 2009): 13.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-13>.

Biernacka, Kinga, Katarzyna Podgórska, Anna Tyszk, et Tomasz Stadejek. « Comparison of Six Commercial ELISAs for the Detection of Antibodies against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Field Serum Samples ». *Research in Veterinary Science* 121 (décembre 2018): 40-45.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.005>.

Bodles-Brakhop, Angela M, Richard Heller, et Ruxandra Draghia-Akli. « Electroporation for the Delivery of DNA-based Vaccines and Immunotherapeutics: Current Clinical Developments ». *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, n° 4 (avril 2009): 585-92.
<https://doi.org/10.1038/mt.2009.5>.

Bordet, Elise, Pauline Maisonnasse, Patricia Renson, Edwige Bouguyon, Elisa Crisci, Mathieu Tiret, Delphine Descamps, et al. « Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Scientific Reports* 8 (5 juillet 2018).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28234-y>.

Borrego, Belén, Jordi M. Argilagué, Eva Pérez-Martín, Javier Dominguez, Mariano Pérez-Filgueira, José M. Escribano, Francisco Sobrino, et Fernando Rodriguez. « A DNA Vaccine Encoding Foot-and-Mouth Disease Virus B and T-Cell Epitopes Targeted to Class II Swine Leukocyte Antigens Protects Pigs against Viral Challenge ». *Antiviral Research* 92, n° 2 (novembre 2011): 359-63.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.017>.

Breathnach, C. C., H. J. Clark, R. C. Clark, C. W. Olsen, H. G. Townsend, et D. P. Lunn. « Immunization with Recombinant Modified Vaccinia Ankara (RMVA) Constructs Encoding the HA or NP Gene Protects Ponies from Equine Influenza Virus Challenge. » *Vaccine* 24, n° 8

(février 2006): 1180-90.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.091>.

Brown, Elizabeth, Steven Lawson, Craig Welbon, Josephine Gnanandarajah, Juan Li, Michael P. Murtaugh, Eric A. Nelson, et al. « Antibody Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Nonstructural Proteins and Implications for Diagnostic Detection and Differentiation of PRRSV Types I and II ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 16, n° 5 (mai 2009): 628-35.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00483-08>.

Burgara-Estrella, Alexel, Ivan Díaz, Irene M. Rodríguez-Gómez, Sabine E. Essler, Jesús Hernández, et Enric Mateu. « Predicted Peptides from Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Are Able to Induce IFN- γ and IL-10 ». *Viruses* 5, n° 2 (février 2013): 663-77.
<https://doi.org/10.3390/v5020663>.

Burkard, Christine, Simon G. Lillico, Elizabeth Reid, Ben Jackson, Alan J. Mileham, Tahar Ait-Ali, C. Bruce A. Whitelaw, et Alan L. Archibald. « Precision Engineering for PRRSV Resistance in Pigs: Macrophages from Genome Edited Pigs Lacking CD163 SRCR5 Domain Are Fully Resistant to Both PRRSV Genotypes While Maintaining Biological Function ». *PLoS Pathogens* 13, n° 2 (février 2017): e1006206.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006206>.

Butler, J. E., K. M. Lager, William Golde, Kay S. Faaberg, Marek Sinkora, Crystal Loving, et Y. I. Zhang. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS): An Immune Dysregulatory Pandemic ». *Immunologic Research* 59, n° 1-3 (1 août 2014): 81-108.
<https://doi.org/10.1007/s12026-014-8549-5>.

Calvert, Jay G., David E. Slade, Shelly L. Shields, Rika Jolie, Ramasamy M. Mannan, Robert G. Ankenbauer, et Siao-Kun W. Welch. « CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses ». *Journal of Virology* 81, n° 14 (juillet 2007): 7371-79. <https://doi.org/10.1128/JVI.00513-07>.

Calvet, Christophe Y, Franck M André, et Lluís M Mir. « Dual therapeutic benefit of electroporation-mediated DNA vaccination in vivo ». *Oncoimmunology* 3 (29 avril 2014).
<https://doi.org/10.4161/onci.28540>.

Caminschi, Irina, Anna I. Proietto, Fatma Ahmet, Susie Kitsoulis, Joo Shin Teh, Jennifer C. Y. Lo, Alexandra Rizzitelli, et al. « The Dendritic Cell Subtype-Restricted C-Type Lectin Clec9A Is a Target for Vaccine Enhancement ». *Blood* 112, n° 8 (15 octobre 2008): 3264-73.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-155176>.

Cao, Jun, Yiqi Jin, Wei Li, Bin Zhang, Yang He, Hongqiang Liu, Ning Xia, Huafeng Wei, et Jian Yan. « DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor

immunity in mice ». *BMC Immunology* 14 (14 août 2013): 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-39>.

Capecchi, M. R. « High Efficiency Transformation by Direct Microinjection of DNA into Cultured Mammalian Cells ». *Cell* 22, n° 2 Pt 2 (novembre 1980): 479-88. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90358-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90358-X)

Cecere, Thomas E., S. Michelle Todd, et Tanya LeRoith. « Regulatory T Cells in Arterivirus and Coronavirus Infections: Do They Protect Against Disease or Enhance It? » *Viruses* 4, n° 5 (15 mai 2012): 833-46. <https://doi.org/10.3390/v4050833>.

Chan, H. T., M. Y. Chia, V. F. Pang, C. R. Jeng, Y. Y. Do, et P. L. Huang. « Oral Immunogenicity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antigen Expressed in Transgenic Banana. » *Plant Biotechnology Journal* 11, n° 3 (avril 2013): 315-24. <https://doi.org/10.1111/pbi.12015>.

Chaplin, P. J., R. De Rose, J. S. Boyle, P. McWaters, J. Kelly, J. M. Tennent, A. M. Lew, et J. P. Scheerlinck. « Targeting Improves the Efficacy of a DNA Vaccine against *Corynebacterium Pseudotuberculosis* in Sheep ». *Infection and Immunity* 67, n° 12 (décembre 1999): 6434-38.

Charemtantanakul, Wasin. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccines: Immunogenicity, Efficacy and Safety Aspects ». *World Journal of Virology* 1, n° 1 (12 février 2012): 23-30. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.23>.

Chen, Hui, Na Gao, Jiangman Wu, Xiaoyan Zheng, Jieqiong Li, Dongying Fan, et Jing An. « Variable Effects of the Co-Administration of a GM-CSF-Expressing Plasmid on the Immune Response to Flavivirus DNA Vaccines in Mice ». *Immunology Letters* 162, n° 1 Pt A (novembre 2014): 140-48. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.005>.

Chen, X., et J. Liu. « Generation and Immunogenicity of Transgenic Potato Expressing the GP5 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. » *Journal of Virological Methods* 173, n° 1 (avril 2011): 153-58. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.001>.

Chia, M. Y., S. H. Hsiao, H. T. Chan, Y. Y. Do, P. L. Huang, H. W. Chang, Y. C. Tsai, C. M. Lin, V. F. Pang, et C. R. Jeng. « Immunogenicity of Recombinant GP5 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Expressed in Tobacco Plant. » *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135, n° 3-4 (juin 2010): 234-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.003>.

Chiu, Yung-Nung, Jared M. Sampson, Xunqing Jiang, Susan B. Zolla-Pazner, et Xiang-Peng Kong. « Skin Tattooing As A Novel Approach For DNA Vaccine Delivery ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 68 (18 octobre 2012). <https://doi.org/10.3791/50032>.

Chrun, Tiphany, Sandra Lacôte, Céline Urien, Luc Jouneau, Céline Barc, Edwige Bouguyon, Vanessa Contreras, et al. « A Rift Valley Fever Virus Gn Ectodomain-Based DNA Vaccine Induces a Partial Protection Not Improved by APC Targeting ». *Npj Vaccines* 3, n° 1 (décembre 2018). <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0052-x>.

Cohn, Lillian, et Lélia Delamarre. « Dendritic Cell-Targeted Vaccines ». *Frontiers in Immunology* 5 (30 mai 2014). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00255>.

Cole, Grace, Ahlam A. Ali, Cian M. McCrudden, John W. McBride, Joanne McCaffrey, Tracy Robson, Vicky L. Kett, Nicholas J. Dunne, Ryan F. Donnelly, et Helen O. McCarthy. « DNA Vaccination for Cervical Cancer: Strategic Optimisation of RALA Mediated Gene Delivery from a Biodegradable Microneedle System ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 127 (juin 2018): 288-97. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.029>.

Combadiere, Behazine, et Christelle Liard. « Transcutaneous and Intradermal Vaccination ». *Human Vaccines* 7, n° 8 (août 2011): 811-27. <https://doi.org/10.4161/hv.7.8.16274>.

Corbett, Holly J., Germain J. P. Fernando, Xianfeng Chen, Ian H. Frazer, et Mark A. F. Kendall. « Skin Vaccination against Cervical Cancer Associated Human Papillomavirus with a Novel Micro-Projection Array in a Mouse Model ». *PLOS ONE* 5, n° 10 (18 octobre 2010): e13460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013460>.

Corder, W. Thomas, Mary Beth Hogan, et Nevin W. Wilson. « Comparison of Two Disposable Plastic Skin Test Devices with the Bifurcated Needle for Epicutaneous Allergy Testing ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 77, n° 3 (1 septembre 1996): 222-26. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63259-0](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63259-0).

Costers, S. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Alveolar Macrophages Contain No Detectable Levels of Viral Proteins in Their Plasma Membrane and Are Protected against Antibody-Dependent, Complement-Mediated Cell Lysis ». *Journal of General Virology* 87, n° 8 (1 août 2006): 2341-51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81808-0>.

Cui, J., C. M. O'Connell, J. D. Smith, Y. Pan, J. A. Smyth, P. H. Verardi, et A. E. Garmendia. « A GP5 Mosaic T-cell vaccine for porcine reproductive and respiratory syndrome virus is immunogenic and confers partial protection to pigs ». *Vaccine Reports* 6 (1 décembre 2016): 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.vacrep.2016.11.003>.

Darwich, Laila, Mariona Gimeno, Marina Sibila, Ivan Diaz, Eugenia de la Torre, Silvia Dotti, Liudmila Kuzemtseva, Margarita Martin, Joan Pujols, et Enric Mateu. « Genetic and

immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains ». *Veterinary Microbiology* 150, n° 1 (12 mai 2011): 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.008>.

Davis, H. L. « Intramuscular and Intradermal Injection of DNA Vaccines in Mice and Primates ». *Methods in Molecular Medicine* 29 (2000): 71-77. <https://doi.org/10.1385/1-59259-688-6:71>.

Dean, Cheryl H., Jason B. Alarcon, Andrea M. Waterston, Ken Draper, Richard Early, Farshad Guirakhoo, Thomas P. Monath, et John A. Mikszta. « Cutaneous Delivery of a Live, Attenuated Chimeric Flavivirus Vaccine against Japanese Encephalitis (ChimeriVax)-JE in Non-Human Primates ». *Human Vaccines* 1, n° 3 (juin 2005): 106-11.

<https://doi.org/10.4161/hv.1.3.1797>

Deloizy, Charlotte, Edwige Bouguyon, Even Fossum, Peter Sebo, Radim Osicka, Angélique Bole, Michel Pierres, et al. « Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: Reagents to porcine CD11c and XCR1 ». *Developmental & Comparative Immunology* 65 (1 décembre 2016): 31-40.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.015>.

Deloizy, Charlotte, Even Fossum, Christophe Barnier-Quer, Céline Urien, Tiphany Chrun, Audrey Duval, Maëlle Codjovi, et al. « The Anti-Influenza M2e Antibody Response Is Promoted by XCR1 Targeting in Pig Skin ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (9 août 2017): 7639. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07372-9>.

Delputte, P. L., P. Meerts, S. Costers, et H. J. Nauwynck. « Effect of Virus-Specific Antibodies on Attachment, Internalization and Infection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Primary Macrophages ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, n° 3 (8 décembre 2004): 179-88. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.007>.

Dhodapkar, Madhav V., Mario Sznol, Biwei Zhao, Ding Wang, Richard D. Carvajal, Mary L. Keohan, Ellen Chuang, et al. « Induction of Antigen-Specific Immunity with a Vaccine Targeting NY-ESO-1 to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 ». *Science Translational Medicine* 6, n° 232 (16 avril 2014): 232ra51. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008068>.

Díaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols, et E. Mateu. « Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs ». *Virology* 351, n° 2 (1 août 2006): 249-59. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.046>.

Díaz, Ivan, Lillianne Ganges, Iván Galindo-Cardiel, Joan Tarradas, Belén Alvarez, Cristina Lorca-Oró, Joan Pujols, et al. « Immunization with DNA Vaccines Containing Porcine Reproductive

and Respiratory Syndrome Virus Open Reading Frames 5, 6, and 7 May Be Related to the Exacerbation of Clinical Disease after an Experimental Challenge ». *Viral Immunology* 26, n° 1 (février 2013): 93-101. <https://doi.org/10.1089/vim.2012.0041>.

Díaz, Ivan, Joan Pujols, Lillianne Ganges, Mariona Gimeno, Laila Darwich, Mariano Domingo, et Enric Mateu. « In Silico Prediction and Ex Vivo Evaluation of Potential T-Cell Epitopes in Glycoproteins 4 and 5 and Nucleocapsid Protein of Genotype-I (European) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Vaccine* 27, n° 41 (18 septembre 2009): 5603-11.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.029>.

Dokland, Terje. « The structural biology of PRRSV ». *Virus Research, Progress in porcine respiratory and reproductive syndrome virus biology and control*, 154, n° 1 (1 décembre 2010): 86-97.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>.

Dong, H., O. Stanek, F. Rudilla Salvador, U. Länger, E. Morillon, C. Ung, P. Sebo, C. Leclerc, et L. Majlessi. « Induction of Protective Immunity against Mycobacterium Tuberculosis by Delivery of ESX Antigens into Airway Dendritic Cells ». *Mucosal Immunology* 6, n° 3 (mai 2013): 522-34. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.92>.

Dong, Shan, Long Liu, Weining Wu, Stuart D. Armstrong, Dong Xia, Hao Nan, Julian A. Hiscox, et Hongying Chen. « Determination of the Interactome of Non-Structural Protein12 from Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus with Host Cellular Proteins Using High Throughput Proteomics and Identification of HSP70 as a Cellular Factor for Virus Replication ». *Journal of Proteomics* 146 (2 septembre 2016): 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.019>.

Dory, Daniel, Vincent Le Moigne, Roland Cariolet, Véronique Béven, André Keranflec'h, et André Jestin. « Targeted Collection of Plasmid DNA in Large and Growing Animal Muscles 6 Weeks after DNA Vaccination with and without Electroporation ». *Research article. Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/326825>.

Dory, Daniel, Michelle Rémond, Véronique Béven, Roland Cariolet, Stephan Zientara, et André Jestin. « Foot-and-Mouth Disease Virus Neutralizing Antibodies Production Induced by PcDNA3 and Sindbis Virus Based Plasmid Encoding FMDV P1-2A3C3D in Swine ». *Antiviral Research* 83, n° 1 (juillet 2009): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.004>.

Dory, Daniel, Anne-Marie Torché, Véronique Béven, Philippe Blanchard, Christophe Loizel, Roland Cariolet, et André Jestin. « Effective Protection of Pigs against Lethal Pseudorabies

Virus Infection after a Single Injection of Low-Dose Sindbis-Derived Plasmids Encoding PrV GB, GC and GD Glycoproteins ». *Vaccine* 23, n° 26 (mai 2005): 3483-91. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.050>.

Du, Yijun, Jing Qi, Yu Lu, Jiaqiang Wu, Dongwan Yoo, Xing Liu, Xiumei Zhang, et al. « Evaluation of a DNA Vaccine Candidate Co-Expressing GP3 and GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) with Interferon α/γ in Immediate and Long-Lasting Protection against HP-PRRSV Challenge ». *Virus Genes* 45, n° 3 (décembre 2012): 474-87. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0790-1>.

Dupuis, Marc, Kimberly Denis-Mize, Carolyn Woo, Cheryl Goldbeck, Mark J. Selby, Minchao Chen, Gillis R. Otten, et al. « Distribution of DNA Vaccines Determines Their Immunogenicity After Intramuscular Injection in Mice ». *The Journal of Immunology* 165, n° 5 (1 septembre 2000): 2850-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2850>.

Duran, Juan Plana, Isabel Climent, Javier Sarraseca, et Alicia Urniza. « Baculovirus Expression of Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 Proteins in Protection ». *Virus Genes* 14:1, 19-29 (1997). <https://doi.org/10.1023/A:1007931322271>

Dutertre, Charles-Antoine, Lin-Fa Wang, et Florent Ginhoux. « Aligning bona fide dendritic cell populations across species ». *Cellular Immunology, Monocytes in Homeostasis and Disease*, 291, n° 1 (1 septembre 2014): 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.08.006>.

Dwivedi, Varun, Cordelia Manickam, Ruthi Patterson, Katie Dodson, Michael Murtaugh, Jordi B. Torrelles, Larry S. Schlesinger, et Gourapura J. Renukaradhya. « Cross-Protective Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Intranasal Delivery of a Live Virus Vaccine with a Potent Adjuvant ». *Vaccine* 29, n° 23 (23 mai 2011): 4058-66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.006>.

Lima, Marcelo de, Asit K. Pattnaik, Eduardo F. Flores, et Fernando A. Osorio. « Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ». *Virology* 353, n° 2 (30 septembre 2006): 410-21. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.036>.

Ebner, F., S. Rausch, L. Scharek-Tedin, R. Pieper, M. Burwinkel, J. Zentek, et S. Hartmann. « A Novel Lineage Transcription Factor Based Analysis Reveals Differences in T Helper Cell Subpopulation Development in Infected and Intrauterine Growth Restricted (IUGR) Piglets ». *Developmental and Comparative Immunology* 46,

n° 2 (octobre 2014): 333-40. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.005>.

Edwards, Jane C., Helen E. Everett, Miriam Pedrera, Helen Mokhtar, Emanuele Marchi, Ferran Soldevila, Daryan A. Kaveh, et al. « CD1⁻ and CD1⁺ porcine blood dendritic cells are enriched for the orthologues of the two major mammalian conventional subsets ». *Scientific Reports* 7 (20 janvier 2017). <https://doi.org/10.1038/srep40942>.

Elnekave, Mazal, Karina Furmanov, et Avi-Hai Hovav. « Intradermal naked plasmid DNA immunization: mechanisms of action ». *Expert Review of Vaccines* 10, n° 8 (1 août 2011): 1169-82. <https://doi.org/10.1586/erv.11.66>.

Fablet, C., C. Marois-Créhan, G. Simon, B. Grasland, A. Jestin, M. Kobisch, F. Madec, et N. Rose. « Infectious Agents Associated with Respiratory Diseases in 125 Farrow-to-Finish Pig Herds: A Cross-Sectional Study ». *Veterinary Microbiology* 157, n° 1-2 (25 mai 2012): 152-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.015>.

Fang, Liurong, Yunbo Jiang, Shaobo Xiao, Chuanshuang Niu, Hui Zhang, et Huanchun Chen. « Enhanced Immunogenicity of the Modified GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Virus Genes* 32, n° 1 (février 2006): 5-11. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-5839-y>.

Fang, Y., P. Schneider, W. P. Zhang, K. S. Faaberg, E. A. Nelson, et R. R. Rowland. « Diversity and Evolution of a Newly Emerged North American Type 1 Porcine Arterivirus: Analysis of Isolates Collected between 1999 and 2004 ». *Archives of Virology* 152, n° 5 (2007): 1009-17. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0936-y>.

Feige, Matthias J., et Johannes Buchner. « Principles and Engineering of Antibody Folding and Assembly ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1844, n° 11 (novembre 2014): 2024-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.06.004>.

Flamar, Anne-Laure, Sandra Zurawski, Felix Scholz, Ingrid Gayet, Ling Ni, Xiao-Hua Li, Eynav Klechevsky, et al. « Noncovalent Assembly of Anti-Dendritic Cell Antibodies and Antigens for Evoking Immune Responses In Vitro and In Vivo ». *The Journal of Immunology*, 3 août 2012, 1102390. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102390>.

Fossum, Even, Gunnveig Grødeland, Dorothea Terhorst, Anders A. Tveita, Elisabeth Vikse, Siri Mjaaland, Sandrine Henri, Bernard Malissen, et Bjarne Bogen. « Vaccine Molecules Targeting Xcr1 on Cross-Presenting DCs Induce Protective CD8⁺ T-Cell Responses against Influenza Virus ». *European Journal of Immunology* 45, n° 2 (février 2015): 624-35. <https://doi.org/10.1002/eji.201445080>.

Frydas, Ilias S., Ivan Trus, Lise K. Kvisgaard, Caroline Bonckaert, Vishwanatha R. A. P. Reddy,

Yewei Li, Lars E. Larsen, et Hans J. Nauwynck. « Different Clinical, Virological, Serological and Tissue Tropism Outcomes of Two New and One Old Belgian Type 1 Subtype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) Isolates ». *Veterinary Research* 46 (21 mars 2015): 37.

<https://doi.org/10.1186/s13567-015-0166-3>.

Fuller, Deborah H., Peter Loudon, et Connie Schmaljohn. « Preclinical and Clinical Progress of Particle-Mediated DNA Vaccines for Infectious Diseases ». *Methods* 40, n° 1 (septembre 2006): 86-97.

<https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2006.05.022>.

Gagnon, C. A., G. Lachapelle, Y. Langelier, B. Massie, et S. Dea. « Adenoviral-Expressed GP5 of Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus Differs in Its Cellular Maturation from the Authentic Viral Protein but Maintains Known Biological Functions. » *Archives of Virology* 148, n° 5 (mai 2003): 951-72.

<https://doi.org/10.1007/s00705-002-0943-y>.

Gao, Jiming, Shuqi Xiao, Yihong Xiao, Xiangpeng Wang, Chong Zhang, Qin Zhao, Yuchen Nan, et al. « MYH9 Is an Essential Factor for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection ». *Scientific Reports* 6 (26 2016): 25120.

<https://doi.org/10.1038/srep25120>.

Geldhof, Marc F, Merijn Vanhee, Wander Van Breedam, Jan Van Doorselaere, Uladzimir U Karniychuk, et Hans J Nauwynck. « Comparison of the efficacy of autogenous inactivated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccines with that of commercial vaccines against homologous and heterologous challenges ». *BMC Veterinary Research* 8 (3 octobre 2012): 182.

<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-182>.

Glansbeek, Harrie L., Bart L. Haagmans, Eddie G. te Lintelo, Herman F. Egberink, Véronique Duquesne, André Aubert, Marian C. Horzinek, et Peter J. M. Rottier. « Adverse effects of feline IL-12 during DNA vaccination against feline infectious peritonitis virus ». *Journal of General Virology* 83, n° 1 (2002): 1-10.

<https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-1-1>.

Graham, Barney S., Mary E. Enama, Martha C. Nason, Ingelise J. Gordon, Sheila A. Peel, Julie E. Ledgerwood, Sarah A. Plummer, et al. « DNA Vaccine Delivered by a Needle-Free Injection Device Improves Potency of Priming for Antibody and CD8+ T-Cell Responses after RAd5 Boost in a Randomized Clinical Trial ». *PloS One* 8, n° 4 (2013): e59340.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059340>.

Grodeland, Gunnveig, Agnete Brunsvik Fredriksen, Geir Åge Løset, Elisabeth Vikse, Lars Fugger, et Bjarne Bogen. « Antigen Targeting to Human HLA Class II Molecules Increases Efficacy

of DNA Vaccination ». *The Journal of Immunology Author Choice* 197, n° 9 (1 novembre 2016): 3575-85.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600893>.

Grunwald, Thomas, et Sebastian Ulbert. « Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases ». *Clinical and Experimental Vaccine Research* 4, n° 1 (janvier 2015): 1-10.

<https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.1.1>.

Gu, Weihong, Longjun Guo, Haidong Yu, Junwei Niu, Mingming Huang, Xiaolei Luo, Ren Li, Zhijun Tian, Li Feng, et Yue Wang. « Involvement of CD16 in Antibody-Dependent Enhancement of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection ». *The Journal of General Virology* 96, n° Pt 7 (juillet 2015): 1712-22.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.000118>.

Gudjonsson, Arnar, Anna Lysén, Sreekumar Balan, Vibeke Sundvold-Gjerstad, Catharina Arnold-Schrauf, Lisa Richter, Espen S. Bækkevold, Marc Dalod, Bjarne Bogen, et Even Fossum. « Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1 + Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses ». *The Journal of Immunology* 198, n° 7 (1 avril 2017): 2785-95.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601881>.

Guilliams, Martin, Florent Ginhoux, Claudia Jakubzick, Shalin H. Naik, Nobuyuki Onai, Barbara U. Schraml, Elodie Segura, Roxane Tussiwand, et Simon Yona. « Dendritic Cells, Monocytes and Macrophages: A Unified Nomenclature Based on Ontogeny ». *Nature Reviews. Immunology* 14, n° 8 (2014): 571-78.

<https://doi.org/10.1038/nri3712>.

Guilliams, Martin, et Lianne Van de Laar. « A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. – *Front. Immunol.*, (11 août 2015).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00406>

Hanada, Kousuke, Yoshiyuki Suzuki, Takashi Nakane, Osamu Hirose, et Takashi Gojobori. « The Origin and Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses ». *Molecular Biology and Evolution* 22, n° 4 (avril 2005): 1024-31.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msi089>.

Hartung, Evelyn, Martina Becker, Annabell Bachem, Nele Reeg, Anika Jäkel, Andreas Hutloff, Harald Weber, et al. « Induction of Potent CD8 T Cell Cytotoxicity by Specific Targeting of Antigen to Cross-Presenting Dendritic Cells In Vivo via Murine or Human XCR1 ». *The Journal of Immunology* 194, n° 3 (2 janvier 2015): 1069-79.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401903>.

Hasson, Sidgi Syed Anwer Abdo, Juma Khalifa Zayid Al-Busaidi, et Talal Abdulmalek Sallam. « The Past, Current and Future Trends in DNA Vaccine Immunisations ». *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5, n° 5 (mai 2015): 344-53. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30366-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30366-X).

Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, et M. C. Nussenzweig. « Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 194, n° 6 (17 septembre 2001): 769-79. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.769>

Hervé, Pierre-Louis, Delphyne Descamps, Charlotte Deloizy, Véronique Dhelft, Daphné Laubretton, Edwige Bouguyon, Abdelhak Boukadiri, et al. « Non-invasive epicutaneous vaccine against Respiratory Syncytial Virus: Preclinical proof of concept ». *Journal of Controlled Release* 243 (10 décembre 2016): 146-59. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.003>.

Hiraishi, Yasuhiro, Subhadra Nandakumar, Seong-O. Choi, Jeong Woo Lee, Yeu-Chun Kim, James E. Posey, Suraj B. Sable, et Mark R. Prausnitz. « Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Using a Microneedle Patch ». *Vaccine* 29, n° 14 (21 mars 2011): 2626-36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.042>.

Hirschberg, Hoang J. H. B., Gijsbert G. P. van de Wijdeven, Heleen Kraan, Jean-Pierre Amorij, et Gideon F. A. Kersten. « Bioneedles as Alternative Delivery System for Hepatitis B Vaccine ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 147, n° 2 (15 octobre 2010): 211-17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.028>.

Hoang, Mylien T., Kevin B. Ita, et Daniel A. Bair. « Solid Microneedles for Transdermal Delivery of Amantadine Hydrochloride and Pramipexole Dihydrochloride ». *Pharmaceutics* 7, n° 4 (28 septembre 2015): 379-96. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040379>.

Hu, Jianzhong, Yanyan Ni, Barbara A. Dryman, X.J. Meng, et Chenming Zhang. « Immunogenicity Study of Plant-Made Oral Subunit Vaccine against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ». *Vaccine* 30, n° 12 (mars 2012): 2068-74. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.059>.

Idayaga, Juliana, Ashira Lubkin, Christopher Fiorese, Mireille H. Lahoud, Irina Caminschi, Yaoxing Huang, Anthony Rodriguez, et al. « Comparable T Helper 1 (Th1) and CD8 T-Cell Immunity by Targeting HIV Gag P24 to CD8 Dendritic Cells within Antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, n° 6 (8 février

2011): 2384-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019547108>.

Jeong, Jiwoon, Kyuhyung Choi, Ikjae Kang, Changhoon Park, et Chanhee Chae. « Evaluation of a 20year Old Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Modified Live Vaccine (Ingelvac®) PRRS MLV against Two Recent Type 2 PRRS Virus Isolates in South Korea ». *Veterinary Microbiology* 192 (30 août 2016): 102-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.006>.

Jiang, Wenming, Ping Jiang, Yufeng Li, Jinyuan Tang, Xianwei Wang, et Su Ma. « Recombinant Adenovirus Expressing GP5 and M Fusion Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Induce Both Humoral and Cell-Mediated Immune Responses in Mice ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, n° 1-2 (15 septembre 2006): 169-80. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.05.001>.

Jiang, Wenming, Ping Jiang, Xianwei Wang, Yufeng Li, Yijun Du, et Xinglong Wang. « Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus ». *Virus Research* 136, n° 1 (1 septembre 2008): 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.016>.

Jiang, Yunbo, Liurong Fang, Shaobo Xiao, Bin Li, Yongfei Pan, Rui Luo, et Huanchun Chen. « A Suicidal DNA Vaccine Co-Expressing Two Major Membrane-Associated Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antigens Induce Protective Responses ». *Biotechnology Letters* 31, n° 4 (avril 2009): 509-18. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9905-0>.

Jones, Stacie M., Scott H. Sicherer, A. Wesley Burks, Donald Y. M. Leung, Robert W. Lindblad, Peter Dawson, Alice K. Henning, et al. « Epicutaneous Immunotherapy for the Treatment of Peanut Allergy in Children and Young Adults ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139, n° 4 (avril 2017): 1242-1252.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.017>.

Karlsson, Ingrid, Marie Borggren, Maiken Worsøe Rosenstjerne, Ramona Trebbien, James A. Williams, Enric Vidal, Júlia Vergara-Alert, et al. « Protective Effect of a Polyvalent Influenza DNA Vaccine in Pigs ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 195 (janvier 2018): 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.11.007>.

Katz, Yitzhak, et Michael R. Goldberg. « Is Epicutaneous Immunotherapy Only Skin Deep? » *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139, n° 4 (2017): 1135-36. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.015>.

Kim, Jeong-Ki, Al-Majhdi Fahad, Kumar Shanmukhappa, et Sanjay Kapil. « Defining the Cellular Target(s) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Blocking Monoclonal Antibody 7G10 ». *Journal of Virology* 80, n° 2

(janvier 2006): 689-96.
<https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.689-696.2006>.

Kim, Yeu-Chun, Jung-Hwan Park, et Mark R. Prausnitz. « Microneedles for drug and vaccine delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Emerging micro- and nanotechnologies for the development of novel drug delivery devices and systems*, 64, n° 14 (novembre 2012): 1547-68.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.005>.

Kim, Yeu-Chun, Fu-Shi Quan, Richard W. Compans, Sang-Moo Kang, et Mark R. Prausnitz. « Formulation of Microneedles Coated with Influenza Virus-like Particle Vaccine ». *AAPS PharmSciTech* 11, n° 3 (30 juillet 2010): 1193-1201.
<https://doi.org/10.1208/s12249-010-9471-3>.

Kim, Yeu-Chun, Dae-Goon Yoo, Richard W. Compans, Sang-Moo Kang, et Mark R. Prausnitz. « Cross-Protection by Co-Immunization with Influenza Hemagglutinin DNA and Inactivated Virus Vaccine Using Coated Microneedles ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 172, n° 2 (10 décembre 2013): 579-88.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.04.016>.

Koutsonanos, Dimitrios G., Maria del Pilar Martin, Vladimir G. Zarnitsyn, Sean P. Sullivan, Richard W. Compans, Mark R. Prausnitz, et Ioanna Skountzou. « Transdermal Influenza Immunization with Vaccine-Coated Microneedle Arrays ». *PLOS ONE* 4, n° 3 (10 mars 2009): e4773.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004773>.

Kroczek, Richard A., et Volker Henn. « The Role of XCR1 and its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells ». *Frontiers in Immunology* 3 (10 février 2012).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00014>.

Kroll, Jeremy, Mike Piontkowski, Poul H. Rathkjen, Francois-Xavier Orveillon, Christian Kraft, et Oliver G. Duran. « Long duration of immunity against a type 1 heterologous PRRS virus challenge in pigs immunised with a novel PRRS MLV vaccine: a randomised controlled study ». *Porcine Health Management* 4, n° 1 (16 mai 2018): 11.
<https://doi.org/10.1186/s40813-018-0087-4>.

Kuhn, Jens H., Michael Lauck, Adam L. Bailey, Alexey M. Shchetinin, Tatyana V. Vishnevskaya, Yiming Bao, Terry Fei Fan Ng, et al. « Reorganization and Expansion of the Nidoviral Family Arteriviridae ». *Archives of Virology* 161, n° 3 (25 novembre 2015): 755-68.
<https://doi.org/10.1007/s00705-015-2672-z>.

Kumar, Amit, Piyanuch Wonganan, Michael A. Sandoval, Xinran Li, Saijie Zhu, et Zhengrong Cui. « Microneedle-Mediated Transcutaneous Immunization with Plasmid DNA Coated on Cationic PLGA Nanoparticles ». *Journal of the Controlled Release: Official Journal of the*

Controlled Release Society 163, n° 2 (28 octobre 2012): 230-39.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.08.011>.

Kurts, Christian. « CD11c: Not Merely a Murine DC Marker, but Also a Useful Vaccination Target ». *European Journal of Immunology* 38, n° 8 (1 août 2008): 2072-75.
<https://doi.org/10.1002/eji.200838645>.

Kwilas, Steve, Jennifer M. Kishimori, Matthew Josleyn, Kurt Jerke, John Ballantyne, et Michael Royals and Jay W. Hooper. « A Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) DNA Vaccine Delivered Using a Spring-Powered Jet Injector Elicits a Potent Neutralizing Antibody Response in Rabbits and Nonhuman Primates ». *Current Gene Therapy*, 31 mai 2014.
<http://www.eurekaselect.com/122337/article>.

Lahoud, Mireille H., Fatma Ahmet, Jian-Guo Zhang, Simone Meuter, Antonia N. Policheni, Susie Kitsoulis, Chin-Nien Lee, et al. « DEC-205 Is a Cell Surface Receptor for CpG Oligonucleotides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, n° 40 (2 octobre 2012): 16270-75.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208796109>.

Lambert, Paul Henri, et Philippe E. Laurent. « Intradermal Vaccine Delivery: Will New Delivery Systems Transform Vaccine Administration? » *Vaccine* 26, n° 26 (19 juin 2008): 3197-3208.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.095>.

Lamontagne, Lucie, Christian Pagé, Renée Larochelle, et Ronald Magar. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Persistence in Blood, Spleen, Lymph Nodes, and Tonsils of Experimentally Infected Pigs Depends on the Level of CD8high T Cells ». *Viral Immunology* 16, n° 3 (2003): 395-406.
<https://doi.org/10.1089/088282403322396181>.

Le Moigne, Vincent, Roland Cariolet, Véronique Béven, André Keranflec'h, André Jestin, et Daniel Dory. « Electroporation Improves the Immune Response Induced by a DNA Vaccine against Pseudorabies Virus Glycoprotein B in Pigs ». *Research in Veterinary Science* 93, n° 2 (octobre 2012): 1032-35.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.020>.

Lehmann, Christian H. K., Lukas Heger, Gordon F. Heidkamp, Anna Baranska, Jennifer J. Lühr, Alana Hoffmann, et Diana Dudziak. « Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies ». *Vaccines* 4, n° 2 (juin 2016): 8.
<https://doi.org/10.3390/vaccines4020008>.

Lei, Yu, et Yousuke Takahama. « XCL1 and XCR1 in the Immune System ». *Microbes and Infection* 14, n° 3 (mars 2012): 262-67.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.003>.

LeRoith, T., S. Hammond, S. M. Todd, Y. Ni, T. Cecere, et K. D. Pelzer. « A Modified Live PRRSV Vaccine and the Pathogenic Parent Strain

Induce Regulatory T Cells in Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma Hyopneumoniae* ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140, n° 3-4 (15 avril 2011): 312-16. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.12.011>.

Li, Bin, Shaobo Xiao, Yanwei Wang, Shanshan Xu, Yunbo Jiang, Huanchun Chen, et Liurong Fang. « Immunogenicity of the Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Protein Encoded by a Synthetic ORF5 Gene ». *Vaccine* 27, n° 13 (18 mars 2009): 1957-63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.098>.

Li, Jessica, Fatma Ahmet, Lucy C. Sullivan, Andrew G. Brooks, Stephen J. Kent, Robert De Rose, Andres M. Salazar, et al. « Antibodies Targeting Clec9A Promote Strong Humoral Immunity without Adjuvant in Mice and Non-Human Primates ». *European Journal of Immunology* 45, n° 3 (mars 2015): 854-64. <https://doi.org/10.1002/eji.201445127>.

Li, Juan, et Michael P. Murtaugh. « Dissociation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralization from antibodies specific to major envelope protein surface epitopes ». *Virology* 433, n° 2 (25 novembre 2012): 367-76. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.026>.

Li, Lei, et Nikolai Petrovsky. « Molecular Mechanisms for Enhanced DNA Vaccine Immunogenicity ». *Expert Review of Vaccines* 15, n° 3 (2016): 313-29. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>.

Li, Yanhua, Ali Tas, Eric J. Snijder, et Ying Fang. « Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF1a-encoded non-structural proteins in virus-infected cells ». *Journal of General Virology* 93, n° 4 (2012): 829-39. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039289-0>.

Lieb, L. M., C. Ramachandran, K. Egbaria, et N. Weiner. « Topical Delivery Enhancement with Multilamellar Liposomes into Pilosebaceous Units: I. In Vitro Evaluation Using Fluorescent Techniques with the Hamster Ear Model. » *The Journal of Investigative Dermatology* 99, n° 1 (juillet 1992): 108-13. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12611886>.

Liu, Long, Jiao Tian, Hao Nan, Mengmeng Tian, Yuan Li, Xiaodong Xu, Baicheng Huang, Enmin Zhou, Julian A. Hiscox, et Hongying Chen. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein Interacts with Nsp9 and Cellular DHX9 To Regulate Viral RNA Synthesis ». *Journal of Virology* 90, n° 11 (01 2016): 5384-98. <https://doi.org/10.1128/JVI.03216-15>.

Liu, Yizhi, Jun Ji, Qingmei Xie, Jing Wang, Huiqin Shang, Cuiying Chen, Feng Chen, et al. « Isolation and Complete Genomic Characterization of H1N1 Subtype Swine Influenza Viruses in Southern China through the 2009 Pandemic ».

Virology Journal 8, n° 1 (20 mars 2011): 129. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-129>.

Loemba, H. D., S. Mounir, H. Mardassi, D. Archambault, et S. Dea. « Kinetics of Humoral Immune Response to the Major Structural Proteins of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Archives of Virology* 141, n° 3-4 (1 mars 1996): 751-61. <https://doi.org/10.1007/BF01718333>.

LohseDr, Louise, et Jens NielsenLis Eriksen. « Temporary CD8+ T-Cell Depletion in Pigs Does Not Exacerbate Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) | *Viral Immunology* », 2004. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2004.17.594>.

Lopez, O. J., M. F. Oliveira, E. Alvarez Garcia, B. J. Kwon, A. Doster, et F. A. Osorio. « Protection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection through Passive Transfer of PRRSV-Neutralizing Antibodies Is Dose Dependent ». *Clinical and Vaccine Immunology* 14, n° 3 (3 janvier 2007): 269-75. <https://doi.org/10.1128/CVI.00304-06>.

Loving, Crystal L., Fernando A. Osorio, Michael P. Murtaugh, et Federico A. Zuckermann. « Innate and Adaptive Immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 167, n° 1-2 (15 septembre 2015): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>.

Lu, Hui, Xiao-Feng Xu, Na Gao, Dong-Ying Fan, Juan Wang, et Jing An. « Preliminary Evaluation of DNA Vaccine Candidates Encoding Dengue-2 PrM/E and NS1: Their Immunity and Protective Efficacy in Mice ». *Molecular Immunology* 54, n° 2 (juin 2013): 109-14. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.11.007>.

Lunney, Joan K., Ying Fang, Andrea Ladinig, Nanhua Chen, Yanhua Li, Bob Rowland, et Gourapura J. Renukaradhya. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System ». *Annual Review of Animal Biosciences* 4, n° 1 (2016): 129-54. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>.

Lyoo, Young S. « Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine does not fit in classical vaccinology ». *Clinical and Experimental Vaccine Research* 4, n° 2 (juillet 2015): 159-65. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.2.159>.

MacLeod, Megan K. L., Alexandria David, Niyun Jin, Laura Noges, Jieru Wang, John W. Kappler, et Philippa Marrack. « Influenza Nucleoprotein Delivered with Aluminium Salts Protects Mice from an Influenza A Virus That Expresses an Altered Nucleoprotein Sequence ». *PLoS ONE* 8, n° 4 (16 avril 2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061775>.

Mahe, Brice, Annika Vogt, Christelle Liard, Darragh Duffy, Valérie Abadie, Olivia Bonduelle, Alexandre Boissonnas, et al. « Nanoparticle-Based Targeting of Vaccine Compounds to Skin Antigen-Presenting Cells By Hair Follicles and their Transport in Mice ». *Journal of Investigative Dermatology* 129, n° 5 (1 mai 2009): 1156-64. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.356>.

Maisonasse, P, E Bouguyon, G Piton, A Ezquerro, C Urien, C Deloizy, M Bourge, et al. « The Respiratory DC/Macrophage Network at Steady-State and upon Influenza Infection in the Swine Biomedical Model ». *Mucosal Immunology* 9, n° 4 (juillet 2016): 835-49. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.105>.

Mann, Jamie F. S., Paul F. McKay, Anezka Fiserova, Katja Klein, Alethea Cope, Paul Rogers, Julie Swales, Michael S. Seaman, Behazine Combadiere, et Robin J. Shattock. « Enhanced Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine Delivered with Electroporation via Combined Intramuscular and Intradermal Routes ». *Journal of Virology* 88, n° 12 (15 juin 2014): 6959-69. <https://doi.org/10.1128/JVI.00183-14>.

Marquet, Florian, Michel Bonneau, Florentina Pascale, Celine Urien, Chantal Kang, Isabelle Schwartz-Cornil, et Nicolas Bertho. « Characterization of Dendritic Cells Subpopulations in Skin and Afferent Lymph in the Swine Model ». Édité par Ludovic Tailleux. *PLoS ONE* 6, n° 1 (27 janvier 2011): e16320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016320>.

Marquet, Florian, Thien-Phong Vu Manh, Pauline Maisonasse, Jamila Elhmouzi-Younes, Céline Urien, Edwige Bouguyon, Luc Jouneau, et al. « Pig Skin Includes Dendritic Cell Subsets Transcriptomically Related to Human CD1a and CD14 Dendritic Cells Presenting Different Migrating Behaviors and T Cell Activation Capacities ». *The Journal of Immunology*, 10 novembre 2014, 1303150. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303150>.

Martinon, Frédéric, Katrin Kaldma, Rein Sikut, Slobodan Culina, Gabrielle Romain, Mari Tuomela, Maarja Adojaan, et al. « Persistent Immune Responses Induced by a Human Immunodeficiency Virus DNA Vaccine Delivered in Association with Electroporation in the Skin of Nonhuman Primates ». *Human Gene Therapy* 20, n° 11 (novembre 2009): 1291-1307. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.044>.

Mateu, E., et I. Diaz. « The Challenge of PRRS Immunology ». *Veterinary Journal* (London, England: 1997) 177, n° 3 (septembre 2008): 345-51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.022>.

Matsuo, Kazuhiko, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, et Shinsaku Nakagawa. « Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery ».

Vaccine 31, n° 19 (1 mai 2013): 2403-15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.022>.

McAllister, Linda, Jonathan Anderson, Kristen Werth, Iksung Cho, Karen Copeland, Nancy Le Cam Bouveret, David Plant, Paul M. Mendelman, et David K. Cobb. « Needle-Free Jet Injection for Administration of Influenza Vaccine: A Randomised Non-Inferiority Trial ». *The Lancet* 384, n° 9944 (23 août 2014): 674-81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60524-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60524-9).

Mikszta, John A., Jason B. Alarcon, John M. Brittingham, Diane E. Sutter, Ronald J. Pettis, et Noel G. Harvey. « Improved Genetic Immunization via Micromechanical Disruption of Skin-Barrier Function and Targeted Epidermal Delivery ». *Nature Medicine* 8, n° 4 (avril 2002): 415-19. <https://doi.org/10.1038/nm0402-415>.

Mokhtar, Helen, Melanie Eck, Sophie B. Morgan, Sabine E. Essler, Jean-Pierre Frossard, Nicolas Ruggli, et Simon P. Graham. « Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity ». *Vaccine* 32, n° 50 (28 novembre 2014): 6828-37. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.054>.

Mokhtar, Helen, Miriam Pedrera, Jean-Pierre Frossard, Lucia Biffar, Sabine E. Hammer, Lise K. Kvisgaard, Lars E. Larsen, et al. « The Non-structural Protein 5 and Matrix Protein Are Antigenic Targets of T Cell Immunity to Genotype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses ». *Frontiers in Immunology* 7 (16 février 2016). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00040>.

Morgan, S. B., J. P. Frossard, F. J. Pallares, J. Gough, T. Stadejek, S. P. Graham, F. Steinbach, T. W. Drew, et F. J. Salguero. « Pathology and Virus Distribution in the Lung and Lymphoid Tissues of Pigs Experimentally Inoculated with Three Distinct Type 1 PRRS Virus Isolates of Varying Pathogenicity ». *Transboundary and Emerging Diseases* 63, n° 3 (1 juin 2016): 285-95. <https://doi.org/10.1111/tbed.12272>.

Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdt, Siamon Gordon, et al. « Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines ». *Immunity* 41, n° 1 (17 juillet 2014): 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.

Nan, Yuchen, Chunyan Wu, Guoqian Gu, Weiyao Sun, Yan-Jin Zhang, et En-Min Zhou. « Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective ». *Frontiers in Microbiology* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01635>.

Nchinda, Godwin, Janelle Kuroiwa, Margarita Oks, Christine Trumpfheller, Chae Gyu Park, Yaoxing Huang, Drew Hannaman, et al. « The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice

by targeting the encoded protein to dendritic cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 118, n° 4 (1 avril 2008): 1427-36. <https://doi.org/10.1172/JCI34224>.

Ni, Yan-Yan, Tanja Opriessnig, Lei Zhou, Dianjun Cao, Yao-Wei Huang, Patrick G. Halbur, et Xiang-Jin Meng. « Attenuation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Molecular Breeding of Virus Envelope Genes from Genetically Divergent Strains ». *Journal of Virology* 87, n° 1 (janvier 2013): 304-13. <https://doi.org/10.1128/JVI.01789-12>.

Nicolas, Jean-François, et Bruno Guy. « Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice ». *Expert Review of Vaccines* 7, n° 8 (1 octobre 2008): 1201-14. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1201>.

Niezold, Thomas, Michael Storcksdieck Genannt Bonsmann, André Maaske, Vladimir Temchura, Vanessa Heinecke, Drew Hannaman, Jan Buer, et al. « DNA Vaccines Encoding DEC205-Targeted Antigens: Immunity or Tolerance? » *Immunology* 145, n° 4 (août 2015): 519-33. <https://doi.org/10.1111/imm.12467>.

Njongmeta, Leo M., Jocelyn Bray, Christopher J. Davies, William C. Davis, Chris J. Howard, Jayne C. Hope, Guy H. Palmer, Wendy C. Brown, et Waithaka Mwangi. « CD205 Antigen Targeting Combined with Dendritic Cell Recruitment Factors and Antigen-Linked CD40L Activation Primes and Expands Significant Antigen-Specific Antibody and CD4(+) T Cell Responses Following DNA Vaccination of Outbred Animals ». *Vaccine* 30, n° 9 (21 février 2012): 1624-35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.110>.

O'Hagan, Derek, Manmohan Singh, Mildred Ugozzoli, Carl Wild, Susan Barnett, Minchao Chen, Mary Schaefer, Barbara Doe, Gillis R. Otten, et Jeffrey B. Ulmer. « Induction of Potent Immune Responses by Cationic Microparticles with Adsorbed Human Immunodeficiency Virus DNA Vaccines ». *Journal of Virology* 75, n° 19 (1 octobre 2001): 9037-43. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.19.9037-9043.2001>.

Ooms, Karen, Hanne Van Gorp, Sara Botti, Tim Van Gaever, Peter L. Delputte, et Hans J. Nauwynck. « Evaluation of Viral Peptide Targeting to Porcine Sialoadhesin Using a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccination-Challenge Model ». *Virus Research* 177, n° 2 (6 novembre 2013): 147-55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.019>.

Ooms, Karen, Hanne Van Gorp, Tim Van Gaever, Hans J. Nauwynck, et Peter L. Delputte. « Development of a recombinant antibody to target peptides and proteins to sialoadhesin-expressing macrophages ». *BMC Biotechnology* 13 (10 avril 2013): 33.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-33>.

Oosterhuis, K., J. H. van den Berg, T. N. Schumacher, et J. B. a. G. Haanen. « DNA Vaccines and Intradermal Vaccination by DNA Tattooing ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 351 (2012): 221-50. https://doi.org/10.1007/82_2010_117.

Ostrowski, M., J. A. Galeota, A. M. Jar, K. B. Platt, F. A. Osorio, et O. J. Lopez. « Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain ». *Journal of Virology* 76, n° 9 (mai 2002): 4241-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.13.6863.2002>

Park, Changhoon, Hwi Won Seo, Kiwon Han, Ikjae Kang, et Chanhee Chae. « Evaluation of the efficacy of a new modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Fostera PRRS) against heterologous PRRSV challenge ». *Veterinary Microbiology* 172, n° 3 (27 août 2014): 432-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.030>.

Pérez-Núñez, Daniel, Sun-Young Sunwoo, Elena G. Sánchez, Nicholas Haley, Raquel García-Belmonte, Marisa Nogal, Igor Morozov, et al. « Evaluation of a Viral DNA-Protein Immunization Strategy against African Swine Fever in Domestic Pigs ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 208 (février 2019): 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.11.018>.

Piñeyro, Pablo E., Sakthivel Subramaniam, Scott P. Kenney, C. Lynn Heffron, Luis G. Giménez-Lirola, et Xiang-Jin Meng. « Modulation of Proinflammatory Cytokines in Monocyte-Derived Dendritic Cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Through Interaction with the Porcine Intercellular-Adhesion-Molecule-3-Grabbing Nonintegrin ». *Viral Immunology* 29, n° 10 (décembre 2016): 546-56. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0104>.

Pokorna, Dana, Ivonne Rubio, et Martin Müller. « DNA-Vaccination via Tattooing Induces Stronger Humoral and Cellular Immune Responses than Intramuscular Delivery Supported by Molecular Adjuvants ». *Genetic Vaccines and Therapy* 6, n° 1 (2008): 4. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-6-4>.

Pol, J. M., L. A. van Leengoed, N. Stockhofe, G. Kok, et G. Wensvoort. « Dual Infections of PRRSV/Influenza or PRRSV/Actinobacillus Pleuropneumoniae in the Respiratory Tract ». *Veterinary Microbiology* 55, n° 1-4 (avril 1997): 259-64. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01323-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01323-5)

Popescu, Luca N., Benjamin R. Tribble, Nanhua Chen, et Raymond R. Rowland. « GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) as a Target for Homologous and Broadly Neutralizing Antibodies ». *Veterinary*

Microbiology 209 (septembre 2017): 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>.

Prather, Kristala Jones, Sangeetha Sagar, Jason Murphy, et Michel Chartrain. « Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification ». *Enzyme and Microbial Technology* 33, n° 7 (2 décembre 2003): 865-83. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00205-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00205-9).

Prather, Randall S., Raymond R. Rowland, Catherine Ewen, Benjamin Tribble, Maureen Kerrigan, Bhupinder Bawa, Jennifer M. Teson, et al. « An Intact Sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) Is Not Required for Attachment/Internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Journal of Virology* 87, n° 17 (septembre 2013): 9538-46. <https://doi.org/10.1128/JVI.00177-13>.

Provost, Chantale, Jian Jun Jia, Nedzad Music, Cynthia Lévesque, Marie-Ève Lebel, Jérôme RE del Castillo, Mario Jacques, et Carl A. Gagnon. « Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line ». *Virology Journal* 9, n° 1 (13 novembre 2012): 267. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-267>.

Qiu, Yuqin, Lei Guo, Suohui Zhang, Bai Xu, Yunhua Gao, Yan Hu, Jun Hou, Bingke Bai, Honghui Shen, et Panyong Mao. « DNA-Based Vaccination against Hepatitis B Virus Using Dissolving Microneedle Arrays Adjuvanted by Cationic Liposomes and CpG ODN ». *Drug Delivery* 23, n° 7 (septembre 2016): 2391-98. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.992497>.

Quaak, S. G. L., J. H. van den Berg, K. Oosterhuis, J. H. Beijnen, J. B. a. G. Haanen, et B. Nuijen. « DNA Tattoo Vaccination: Effect on Plasmid Purity and Transfection Efficiency of Different Topoisomers ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 139, n° 2 (15 octobre 2009): 153-59. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.033>.

Quattrocchi, Valeria, Ivana Soria, Cecilia Ana Langellotti, Victoria Gnazzo, Mariela Gammella, Dadin P. Moore, et Patricia I. Zamorano. « A DNA Vaccine Formulated with Chemical Adjuvant Provides Partial Protection against Bovine Herpes Virus Infection in Cattle ». *Frontiers in Immunology* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00037>.

Radford, Kristen J., et Irina Caminschi. « New generation of dendritic cell vaccines ». *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9, n° 2 (1 février 2013): 259-64. <https://doi.org/10.4161/hv.22487>.

Rahe, Michael C., et Michael P. Murtaugh. « Effector mechanisms of humoral immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus ». *Veterinary Immunology and*

Immunopathology 186 (1 avril 2017a): 15-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.02.002>.

Rahe, Michael C. and Murtaugh, Michael P. « Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Viruses* 9, n° 6 (13 juin 2017a). <https://doi.org/10.3390/v9060148>.

Rascón-Castelo, Edgar, Alexel Burgara-Estrella, Enric Mateu, et Jesús Hernández. « Immunological Features of the Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Viruses* 7, n° 3 (mars 2015): 873-86. <https://doi.org/10.3390/v7030873>.

Ravi, Ansh Dev, D. Sadhna, D. Nagpaal, et L. Chawla. « Needle Free Injection Technology: A Complete Insight ». *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 5, n° 4 (10 janvier 2015): 192. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.167662>.

Raviprakash, Kanakatte, et Kevin R. Porter. « Needle-Free Injection of DNA Vaccines: A Brief Overview and Methodology ». In *DNA Vaccines: Methods and Protocols*, édité par W. Mark Saltzman, Hong Shen, et Janet L. Brandsma, 83-89. *Methods in Molecular Medicine™*. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. <https://doi.org/10.1385/1-59745-168-1:83>.

Redding, Laurel, et David B. Weiner. « DNA Vaccines in Veterinary Use ». *Expert Review of Vaccines* 8, n° 9 (septembre 2009): 1251-76. <https://doi.org/10.1586/erv.09.77>.

Renukaradhya, Gourapura J., Konstantin Alekseev, Kwonil Jung, Ying Fang, et Linda J. Saif. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Immunosuppression Exacerbates the Inflammatory Response to Porcine Respiratory Coronavirus in Pigs ». *Viral Immunology* 23, n° 5 (octobre 2010): 457-66. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0051>.

Renukaradhya, Gourapura J., Xiang-Jin Meng, Jay G. Calvert, Michael Roof, et Kelly M. Lager. « Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction ». *Vaccine* 33, n° 27 (17 juin 2015): 3065-72. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.102>.

Ricklin, Meret E., Sylvie Python, Nathalie J. Vielle, Daniel Brechbühl, Beatrice Zumkehr, Horst Posthaus, Gert Zimmer, Nicolas Ruggli, et Artur Summerfield. « Virus Replicon Particle Vaccines Expressing Nucleoprotein of Influenza A Virus Mediate Enhanced Inflammatory Responses in Pigs ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (27 novembre 2017): 16379. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16419-w>.

Robinson, Sally R., Michael C. Rahe, Diem K. Gray, Kyra V. Martins, et Michael P. Murtaugh. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Neutralizing Antibodies Provide in Vivo Cross-Protection to PRRSV1 and PRRSV2 Viral

Challenge ». *Virus Research* 248 (15 mars 2018): 13-23.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.01.015>.

Roca, M., M. Gimeno, S. Bruguera, J. Segalés, I. Díaz, I. J. Galindo-Cardiel, E. Martínez, et al. « Effects of Challenge with a Virulent Genotype II Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on Piglets Vaccinated with an Attenuated Genotype I Strain Vaccine. » *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 193, n° 1 (juillet 2012): 92-96.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.019>.

Rodrigues, Patrick Fernandes, Lluçia Alberti-Servera, Anna Eremin, Gary E. Grajales-Reyes, Robert Ivanek, et Roxane Tussiwand. « Distinct Progenitor Lineages Contribute to the Heterogeneity of Plasmacytoid Dendritic Cells ». *Nature Immunology*, 20 juin 2018. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0136-9>.

Roos, Anna-Karin, Fredrik Eriksson, Derin C. Walters, Pavel Pisa, et Alan D. King. « Optimization of Skin Electroporation in Mice to Increase Tolerability of DNA Vaccine Delivery to Patients ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17, n° 9 (septembre 2009): 1637-42. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.120>.

Roques, Elodie, Aurélie Girard, Marie-Claude St-Louis, Bernard Massie, Carl A Gagnon, Martin Lessard, et Denis Archambault. « Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but non-disseminating adenovectors ». *Veterinary Research* 44, n° 1 (2013): 17. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-17>.

Rose, N., P. Renson, M. Andraud, F. Paboeuf, M. F. Le Potier, et O. Bourry. « Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions ». *Vaccine* 33, n° 21 (15 mai 2015): 2493-99. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.040>.

Rotolo, Marisa L., Luis Giménez-Lirola, Ju Ji, Ronaldo Magtoto, Yuly A. Henao-Díaz, Chong Wang, David H. Baum, Karen M. Harmon, Rodger G. Main, et Jeffrey J. Zimmerman. « Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific IgM-IgA in oral fluid samples reveals PRRSV infection in the presence of maternal antibody ». *Veterinary Microbiology* 214 (1 février 2018): 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.011>.

Saade, Fadi, et Nikolai Petrovsky. « Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines ». *Expert Review of Vaccines* 11, n° 2 (février 2012): 189-209. <https://doi.org/10.1586/erv.11.188>.

Sadhu, Chanchal, Harold J. Ting, Brian Lipsky, Kelly Hensley, Leon F. Garcia-Martinez, Scott I.

Simon, et Donald E. Staunton. « CD11c/CD18: Novel Ligands and a Role in Delayed-Type Hypersensitivity ». *Journal of Leukocyte Biology* 81, n° 6 (2007): 1395-1403. <https://doi.org/10.1189/jlb.1106680>.

Salguero, Francisco J., Jean-Pierre Frossard, Johanna M. J. Rebel, Tomasz Stadejek, Sophie B. Morgan, Simon P. Graham, et Falko Steinbach. « Host-pathogen interactions during porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection of piglets ». *Virus Research, Nidoviruses II*, 202 (16 avril 2015): 135-43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.026>.

Sandbulte, Matthew R., Anna R. Spickler, Pamela K. Zaabel, et James A. Roth. « Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine ». *Vaccines* 3, n° 1 (30 janvier 2015): 22-73. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010022>.

Satpathy, Ansuman T., Carlos G. Briseño, Jacob S. Lee, Dennis Ng, Nicholas A. Manieri, Wumesh Kc, Xiaodi Wu, et al. « Notch2-Dependent Classical Dendritic Cells Orchestrate Intestinal Immunity to Attaching-and-Effacing Bacterial Pathogens ». *Nature Immunology* 14, n° 9 (septembre 2013): 937-48. <https://doi.org/10.1038/ni.2679>.

Schultheis, Katherine, Trevor R. F. Smith, William B. Kiosses, Kimberly A. Kraynyak, Amelia Wong, Janet Oh, et Kate E. Broderick. « Delineating the Cellular Mechanisms Associated with Skin Electroporation ». *Human Gene Therapy Methods* 29, n° 4 (août 2018): 177-88. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.105>.

Shen, G., N. Jin, M. Ma, K. Jin, M. Zheng, T. Zhuang, H. Lu, et al. « Immune Responses of Pigs Inoculated with a Recombinant Fowlpox Virus Coexpressing GP5/GP3 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Swine IL-18. » *Vaccine* 25, n° 21 (mai 2007): 4193-4202. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.010>.

Shi, Chongxu, Yali Liu, Yaozhong Ding, Yongguang Zhang, et Jie Zhang. « PRRSV Receptors and Their Roles in Virus Infection ». *Archives of Microbiology* 197, n° 4 (1 mai 2015): 503-12. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1088-1>.

Shi, Mang, Tommy Tsan-Yuk Lam, Chung-Chau Hon, Raymond Kin-Hei Hui, Kay S. Faaberg, Trevor Wennblom, Michael P. Murtaugh, Tomasz Stadejek, et Frederick Chi-Ching Leung. « Molecular Epidemiology of PRRSV: A Phylogenetic Perspective ». *Virus Research* 154, n° 1-2 (décembre 2010): 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.014>.

Shrimpton, Rachel E., Matt Butler, Anne-Sophie Morel, Efreem Eren, Swee Shan Hue, et Mary A. Ritter. « CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self ». *Molecular Immunology* 46, n° 6 (mars 2009):

1229-39.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.11.016>.

Silva-Campa, Erika, Lorena Cordoba, Lorenzo Fraile, Lilian Flores-Mendoza, María Montoya, et Jesús Hernández. « European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells ». *Virology* 396, n° 2 (20 janvier 2010): 264-71.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.024>.

Singleton, Helen, Simon P. Graham, Katherine B. Bodman-Smith, Jean-Pierre Frossard, et Falko Steinbach. « Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1 ». *Frontiers in Microbiology* 7 (2 juin 2016).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00832>.

Sirisereewan, Chaitawat, Teerawut Nedumpun, Sawang Kedsangakonwut, Yonlayong Woonwong, Roongtham Kedkovid, Jirapat Arunorat, Roongroje Thanawongnuwech, et Sanipa Suradhat. « Positive Immunomodulatory Effects of Heterologous DNA Vaccine- Modified Live Vaccine, Prime-Boost Immunization, against the Highly-Pathogenic PRRSV Infection ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 183 (janvier 2017): 7-15.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.11.002>.

Snijder, Eric J., et Marjolein Kikkert. « Arteriviruses ». In *Fields Virology Sixth Edition*, 6^e éd., One:2664, 2013, chap. 29 p.859-879.

Song, Cheng, Ray Lu, Dorothee Bienzle, Hsiao-Ching Liu, et Dongwan Yoo. « Interaction of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein with the Inhibitor of MyoD Family-a Domain-Containing Protein ». *Biological Chemistry* 390, n° 3 (mars 2009): 215-23.
<https://doi.org/10.1515/BC.2009.028>.

Song, Jae-Min, Yeu-Chun Kim, Aleksandr S. Lipatov, Marc Pearton, C. Todd Davis, Dae-Goon Yoo, Kyoung-Mi Park, et al. « Microneedle Delivery of H5N1 Influenza Virus-Like Particles to the Skin Induces Long-Lasting B- and T-Cell Responses in Mice ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 17, n° 9 (septembre 2010): 1381-89.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00100-10>.

Song, Yanhua, Yefei Zhou, Yufeng Li, Xianwei Wang, Juan Bai, Jun Cao, et Ping Jiang. « Identification of B-Cell Epitopes in the NSP1 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Veterinary Microbiology* 155, n° 2-4 (23 mars 2012): 220-29.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.018>.

Sørensen, K. J., B. Strandbygaard, A. Bøtner, E. S. Madsen, J. Nielsen, et P. Have. « Blocking ELISA's for the Distinction between Antibodies against European and American Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ».

Veterinary Microbiology 60, n° 2-4 (28 février 1998): 169-77.

[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00159-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00159-X)

Stankevicius, Arunas, Jurate Buitkuviene, Virginija Sutkiene, Ugne Spancerniene, Ina Pampariene, Arnoldas Pautienius, Vaidas Oberauskas, Henrikas Zilinskas, et Judita Zymantiene. « Detection and molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Lithuanian wild boar populations ». *Acta Veterinaria Scandinavica* 58 (8 septembre 2016).
<https://doi.org/10.1186/s13028-016-0232-5>.

Subramaniam, Sakthivel, Dianjun Cao, Debin Tian, Qian M. Cao, Christopher Overend, Danielle M. Yugo, Shannon R. Matzinger, et al. « Efficient Priming of CD4 T Cells by Langerin-Expressing Dendritic Cells Targeted with Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein Domains in Pigs ». *Virus Research* 227 (02 2017): 212-19.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.007>.

Subramaniam, Sakthivel, Pablo Piñeyro, Rachel J. Derscheid, Darin M. Madson, Drew R. Magstadt, et Xiang-Jin Meng. « Dendritic cell-targeted porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens adjuvanted with polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) induced non-protective immune responses against heterologous type 2 PRRSV challenge in pigs ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 190 (1 août 2017): 18-25.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.003>.

Subramaniam, Sakthivel, Pablo Piñeyro, Debin Tian, Christopher Overend, Danielle M. Yugo, Shannon R. Matzinger, Adam J. Rogers, et al. « In Vivo Targeting of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antigen through Porcine DC-SIGN to Dendritic Cells Elicits Antigen-Specific CD4T Cell Immunity in Pigs ». *Vaccine* 32, n° 50 (28 novembre 2014): 6768-75.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.005>.

Suh, Hyemee, Juhjung Shin, et Yeu-Chun Kim. « Microneedle patches for vaccine delivery ». *Clinical and Experimental Vaccine Research* 3, n° 1 (janvier 2014): 42-49.
<https://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.42>.

Sullivan, Sean P., Dimitrios G. Koutsonanos, Maria del Pilar Martin, Jeong Woo Lee, Vladimir Zarnitsyn, Seong-O. Choi, Niren Murthy, Richard W. Compans, Ioanna Skountzou, et Mark R. Prausnitz. « Dissolving Polymer Microneedle Patches for Influenza Vaccination ». *Nature Medicine* 16, n° 8 (août 2010): 915-20.
<https://doi.org/10.1038/nm.2182>.

Suradhat, Sanipa, Piya Wongyanin, Sawang Kedsangakonwut, Komkrich Teankum, Mongkol Lumyai, Sittikorn Triyarach, et Roongroje Thanawongnuwech. « A Novel DNA Vaccine for Reduction of PRRSV-Induced Negative Immunomodulatory Effects: A Proof of Concept ».

Vaccine 33, n° 32 (31 juillet 2015): 3997-4003.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.020>.

Suschak, John J., Shixia Wang, Katherine A. Fitzgerald, et Shan Lu. « A CGAS-Independent STING/IRF7 Pathway Mediates the Immunogenicity of DNA Vaccines ». *The Journal of Immunology* 196, n° 1 (1 janvier 2016): 310-16.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501836>.

Tachedjian, M., J. S. Boyle, A. M. Lew, B. Horvatic, J. P. Scheerlinck, J. M. Tennent, et M. E. Andrew. « Gene Gun Immunization in a Preclinical Model Is Enhanced by B7 Targeting. » *Vaccine* 21, n° 21-22 (juin 2003): 2900-2905.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00162-2).

Tang, Deyuan, Jian Liu, Chunyan Li, Hua Zhang, Ping Ma, Xianfeng Luo, Zhiyong Zeng, et al. « Positive effects of porcine IL-2 and IL-4 on virus-specific immune responses induced by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 DNA vaccine in swine ». *Journal of Veterinary Science* 15, n° 1 (mars 2014): 99-109.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.99>.

Teifke, J. P., M. Dauber, D. Fichtner, M. Lenk, U. Polster, E. Weiland, et J. Beyer. « Detection of European Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Porcine Alveolar Macrophages by Two-Colour Immunofluorescence and in-Situ Hybridization-Immunohistochemistry Double Labelling ». *Journal of Comparative Pathology* 124, n° 4 (mai 2001): 238-45.
<https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0458>.

Temple, Déborah, Damián Escribano, Marta Jiménez, Eva Mainau, José J. Cerón, et Xavier Manteca. « Effect of the needle-free “intra dermal application of liquids” vaccination on the welfare of pregnant sows ». *Porcine Health Management* 3 (4 avril 2017).
<https://doi.org/10.1186/s40813-017-0056-3>.

Terhorst, Dorothea, Even Fossum, Anna Baranska, Samira Tamoutounour, Camille Malosse, Mattia Garbani, Reinhard Braun, et al. « Laser-Assisted Intradermal Delivery of Adjuvant-Free Vaccines Targeting XCR1+ Dendritic Cells Induces Potent Antitumoral Responses ». *The Journal of Immunology*, 4 mai 2015, 1500564.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500564>.

Tesoro Cruz, E., R. Hernández González, R. Alonso Morales, et A. Aguilar-Setién. « Rabies DNA Vaccination by the Intranasal Route in Dogs ». *Developments in Biologicals* 125 (2006): 221-31.

Tian, Debin, Yan-Yan Ni, Lei Zhou, Tanja Opriessnig, Dianjun Cao, Pablo Piñeyro, Danielle M. Yugo, et al. « Chimeric Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Containing Shuffled Multiple Envelope Genes Confers Cross-Protection in Pigs ». *Virology* 485 (novembre 2015): 402-13.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.021>.

Todorova, Biliana, Lucille Adam, Slobodan Culina, Raphaël Boisgard, Frédéric Martinon, Antonio Cosma, Mart Ustav, Thierry Kortulewski, Roger Le Grand, et Catherine Chapon. « Electroporation as a Vaccine Delivery System and a Natural Adjuvant to Intradermal Administration of Plasmid DNA in Macaques ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (23 juin 2017): 4122.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04547-2>.

Tolmasky, et Alonso, éd. « Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases ». In *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 651-68. American Society of Microbiology, 2015.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0028-2014>.

Trang, Nguyen Thi, Takuya Hirai, Tsukasa Yamamoto, Mari Matsuda, Naoko Okumura, Nguyen Thi Huong Giang, Nguyen Thi Lan, et Ryoji Yamaguchi. « Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Oral Fluid from Naturally Infected Pigs in a Breeding Herd ». *Journal of Veterinary Science* 15, n° 3 (2014): 361-67.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.3.361>

Tribble, Benjamin R., Luca N. Popescu, Nicholas Monday, Jay G. Calvert, et Raymond R. Rowland. « A Single Amino Acid Deletion in the Matrix Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Confers Resistance to a Polyclonal Swine Antibody with Broadly Neutralizing Activity ». *Journal of Virology* 89, n° 12 (juin 2015): 6515-20.
<https://doi.org/10.1128/JVI.03287-14>.

Trus, Ivan, Ilias S. Frydas, Vishwanatha R. A. P. Reddy, Caroline Bonckaert, Yewei Li, Lise K. Kvisgaard, Lars E. Larsen, et Hans J. Nauwynck. « Immunity Raised by Recent European Subtype 1 PRRSV Strains Allows Better Replication of East European Subtype 3 PRRSV Strain Lena than That Raised by an Older Strain ». *Veterinary Research* 47 (8 janvier 2016): 15.
<https://doi.org/10.1186/s13567-015-0292-y>.

Tussiwand, Roxane, Bart Everts, Gary E. Grajales-Reyes, Nicole M. Kretzer, Arifumi Iwata, Juhi Bagaitkar, Xiaodi Wu, et al. « Klf4 Expression in Conventional Dendritic Cells Is Required for T Helper 2 Cell Responses ». *Immunity* 42, n° 5 (19 mai 2015): 916-28.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.017>.

Reeth, K. van, et H. Nauwynck. « Proinflammatory Cytokines and Viral Respiratory Disease in Pigs ». *Veterinary Research* 31, n° 2 (avril 2000): 187-213.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2000113>.

Uotila, Liisa M., Maria Aatonen, et Carl G. Gahmberg. « Integrin CD11c/CD18 α -Chain Phosphorylation Is Functionally Important ». *Journal of Biological Chemistry*, 15 octobre 2013,

jbc.C113.497446.

<https://doi.org/10.1074/jbc.C113.497446>.

Van Gorp, Hanne, Wander Van Breedam, Peter L. Delpitte, et Hans J. Nauwynck. « Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus ». *Journal of General Virology* 89, n° 12 (2008): 2943-53.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/005009-0>.

Van Reeth, K., H. Nauwynck, et M. Pensaert. « Dual Infections of Feeder Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Followed by Porcine Respiratory Coronavirus or Swine Influenza Virus: A Clinical and Virological Study ». *Veterinary Microbiology* 48, n° 3-4 (février 1996): 325-35.

[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00145-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00145-X)

Vandermeulen, Gaëlle, Kevin Vanvarenberg, Ans De Beuckelaer, Stefaan De Koker, Laure Lambricht, Catherine Uyttenhove, Anca Reschner, Alain Vanderplasschen, Johan Grooten, et Véronique Pr at. « The Site of Administration Influences Both the Type and the Magnitude of the Immune Response Induced by DNA Vaccine Electroporation ». *Vaccine* 33, n° 28 (22 juin 2015): 3179-85.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.005>.

Vanhee, Merijn, Sarah Costers, Wander Van Breedam, Marc F. Geldhof, Jan Van Doorselaere, et Hans J. Nauwynck. « A Variable Region in GP4 of European-Type Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Induces Neutralizing Antibodies Against Homologous But Not Heterologous Virus Strains ». *Viral Immunology* 23, n° 4 (août 2010): 403-13.

<https://doi.org/10.1089/vim.2010.0025>.

Vimolmangkang, Sornkanok, Ksenija Gasic, Ruth Soria-Guerra, Sergio Rosales-Mendoza, Leticia Moreno-Fierros, et Schuyler S. Korban. « Expression of the Nucleocapsid Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Soybean Seed Yields an Immunogenic Antigenic Protein ». *Planta* 235, n° 3 (mars 2012): 513-22.

<https://doi.org/10.1007/s00425-011-1523-8>.

Vogt, A., B. Mah e, D. Costagliola, O. Bonduelle, S. Hadam, G. Schaefer, H. Schaefer, et al. « Transcutaneous Anti-Influenza Vaccination Promotes Both CD4 and CD8 T Cell Immune Responses in Humans. » *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, n° 3 (février 2008): 1482-89.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1482>.

Vogt, Annika, Behazine Combadiere, Sabrina Hadam, Karola M. Stieler, Juergen Lademann, Hans Schaefer, Brigitte Aufran, Wolfram Sterry, et Ulrike Blume-Peytavi. « 40nm, but not 750 or 1,500nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a+ Cells after Transcutaneous Application on Human Skin ». *Journal of Investigative Dermatology* 126,

n° 6 (1 juin 2006): 1316-22.

<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700226>.

Vrdoljak, Anto, Evin A. Allen, Francesca Ferrara, Nigel J. Temperton, Abina M. Crean, et Anne C. Moore. « Induction of broad immunity by thermostabilised vaccines incorporated in dissolvable microneedles using novel fabrication methods ». *Journal of Controlled Release* 225 (10 mars 2016): 192-204.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.019>.

Vrdoljak, Anto, Marie G. McGrath, John B. Carey, Simon J. Draper, Adrian V. S. Hill, Conor O'Mahony, Abina M. Crean, et Anne C. Moore. « Coated Microneedle Arrays for Transcutaneous Delivery of Live Virus Vaccines ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 159, n° 1 (10 avril 2012): 34-42.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.026>.

Vu, Hiep L. X., Fangrui Ma, William W. Laegreid, Asit K. Pattnaik, David Steffen, Alan R. Doster, et Fernando A. Osorio. « A Synthetic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Confers Unprecedented Levels of Heterologous Protection ». *Journal of Virology* 89, n° 23 (d cembre 2015): 12070-83.

<https://doi.org/10.1128/JVI.01657-15>.

Vu Manh, Thien-Phong, Nicolas Bertho, Anne Hosmalin, Isabelle Schwartz-Cornil, et Marc Dalod. « Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions ». *Frontiers in Immunology* 6 (2015): 260.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00260>.

Vu Manh, Thien-Phong, Jamila Elhmouzi-Younes, C line Urien, Suzana Ruscanu, Luc Jouneau, Micka l Bourge, Marco Moroldo, et al. « Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics ». *Frontiers in Immunology* 6 (2015): 299.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00299>.

Wang, Heng, Rongchang Liu, Weidong Zhang, Lingshuang Sun, Zhangyong Ning, Fangxiao Ji, Jin Cui, et Guihong Zhang. « Identification of Epitopes on Nonstructural Protein 7 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Recognized by Monoclonal Antibodies Using Phage-Display Technology ». *Virus Genes* 53, n° 4 (1 août 2017): 623-35.

<https://doi.org/10.1007/s11262-017-1472-9>.

Wang, Qun, Wei Cao, Zhi-Gang Yang, et Guang-Fa Zhao. « DC targeting DNA vaccines induce protective and therapeutic antitumor immunity in mice ». *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, n° 10 (15 octobre 2015): 17565-77.

Wang, Ting, Liurong Fang, Fuwei Zhao, Dang Wang, et Shaobo Xiao. « Exosomes Mediate Intercellular Transmission of Porcine Reproductive

and Respiratory Syndrome Virus ». *Journal of Virology* 92, n° 4 (15 février 2018). <https://doi.org/10.1128/JVI.01734-17>.

Wang, Yalan, Haiyan Zhao, Zhitao Ma, Yongqiang Wang, et Wen-hai Feng. « CTLA4 Mediated Targeting Enhances Immunogenicity against PRRSV in a DNA Prime/Killed Virus Boost Strategy ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 154, n° 3-4 (15 août 2013): 121-28. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.05.008>.

Wells, Kevin D., Rachel Bardot, Kristin M. Whitworth, Benjamin R. Tribble, Ying Fang, Alan Mileham, Maureen A. Kerrigan, Melissa S. Samuel, Randall S. Prather, et Raymond R. Rowland. « Replacement of Porcine CD163 Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 with a CD163-Like Homolog Confers Resistance of Pigs to Genotype 1 but Not Genotype 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». Édité par Stanley Perlman. *Journal of Virology* 91, n° 2 (15 janvier 2017). <https://doi.org/10.1128/JVI.01521-16>.

Wenhui, Lu, Wei Zhongyan, Zhang Guanqun, Li Zhili, Ma JingYun, Xie Qingmei, Sun Baoli, et Bi Yingzuo. « Complete Genome Sequence of a Novel Variant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Strain: Evidence for Recombination between Vaccine and Wild-Type PRRSV Strains ». *Journal of Virology* 86, n° 17 (septembre 2012): 9543. <https://doi.org/10.1128/JVI.01341-12>.

Wernike, Kerstin, Paolo Bonilauri, Malte Dauber, Jane Errington, Neil LeBlanc, Sandra Revilla-Fernández, Charlotte Hjulsager, et al. « Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus », *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(5) (17 juillet 2012)- 855-866. <https://doi.org/10.1177/1040638712452724>

Wills, Robert W., Alan R. Doster, Judith A. Galeota, Jung-Hyang Sur, et Fernando A. Osorio. « Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Journal of Clinical Microbiology* 41, n° 1 (janvier 2003): 58-62. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.58-62.2003>

Wongyanin, P., S. Buranapraditkun, K. Chokeshai-usaha, R. Thanawonguwech, et S. Suradhat. « Induction of inducible CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 133, n° 2 (15 février 2010): 170-82. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.07.012>.

Wongyanin, Piya, Supranee Buranapraditkul, Dongwan Yoo, Roongroje Thanawonguwech, James A. Roth, et Sanipa Suradhat. « Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of

interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg) ». *Journal of General Virology* 93, n° 6 (2012): 1236-46. <https://doi.org/10.1099/vir.0.040287-0>.

Wu, Junjing, Xianwen Peng, Ao Zhou, Mu Qiao, Huayu Wu, Hongwei Xiao, Guisheng Liu, Xinmin Zheng, Shujun Zhang, et Shuqi Mei. « MiR-506 Inhibits PRRSV Replication in MARC-145 Cells via CD151 ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 394, n° 1-2 (septembre 2014): 275-81. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2103-6>.

Yang, Huaqiang, Jian Zhang, Xianwei Zhang, Junsong Shi, Yongfei Pan, Rong Zhou, Guoling Li, Zicong Li, Gengyuan Cai, et Zhenfang Wu. « CD163 Knockout Pigs Are Fully Resistant to Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ». *Antiviral Research* 151 (mars 2018): 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.004>.

Yin, D., W. Liang, S. Xing, Z. Gao, W. Zhang, Z. Guo, et S. Gao. « Hepatitis B DNA Vaccine-Polycation Nano-Complexes Enhancing Immune Response by Percutaneous Administration with Microneedle. » *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 36, n° 8 (2013): 1283-91. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00050>.

Yoon, Hyun A., Abi G. Aleyas, Junu A. George, Seong Ok Park, Young Woo Han, John Hwa Lee, Ho Young Kang, Seong Ho Kang, Jeong Gon Cho, et Seong Kug Eo. « Modulation of Immune Responses Induced by DNA Vaccine Expressing Glycoprotein B of Pseudorabies Virus via Coadministration of IFN-Gamma-Associated Cytokines ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 26, n° 10 (octobre 2006): 730-38. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.26.730>.

Yoon, I. J., H. S. Joo, S. M. Goyal, et T. W. Molitor. « A Modified Serum Neutralization Test for the Detection of Antibody to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine Sera ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 6, n° 3 (juillet 1994): 289-92. <https://doi.org/10.1177/104063879400600326>.

Zhang, L., L. Zhou, X. Ge, X. Guo, J. Han, et H. Yang. « The Chinese Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection Suppresses Th17 Cells Response in Vivo. » *Veterinary Microbiology* 189 (juin 2016): 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.001>.

Zhang, Naru, Bo-Jian Zheng, Lu Lu, Yusen Zhou, Shibo Jiang, et Lanying Du. « Advancements in the Development of Subunit Influenza Vaccines ». *Microbes and Infection* 17, n° 2 (février 2015): 123-34. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.006>.

Zhao, Kai, Yang Zhang, Xiaoyan Zhang, Ci Shi, Xin Wang, Xiaohua Wang, Zheng Jin, et Shangjin Cui. « Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine ». *International Journal of Nanomedicine* 9 (30 septembre 2014): 4609-19. <https://doi.org/10.2147/IJN.S70633>.

Zheng, Qisheng, Desheng Chen, Peng Li, Zhixiang Bi, Ruibing Cao, Bin Zhou, et Puyan Chen. « Co-Expressing GP5 and M Proteins under Different Promoters in Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara (RMVA)-Based Vaccine Vector Enhanced the Humoral and Cellular Immune Responses of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ». *Virus Genes* 35, n° 3 (1 décembre 2007): 585-95. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0161-5>.

Zhou, L., Y. Y. Ni, P. Piñeyro, B. J. Sanford, C. M. Cossaboom, B. A. Dryman, Y. W. Huang, D. J. Cao, et X. J. Meng. « DNA Shuffling of the GP3 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Produces a Chimeric Virus with an Improved Cross-Neutralizing Ability against a Heterologous PRRSV Strain. » *Virology* 434, n° 1 (décembre 2012): 96-109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.005>.

Zhou, Lei, Yan-Yan Ni, Pablo Piñeyro, Caitlin M. Cossaboom, Sakthivel Subramaniam, Brenton J.

Sanford, Barbara A. Dryman, Yao-Wei Huang, et Xiang-Jin Meng. « Broadening the Heterologous Cross-Neutralizing Antibody Inducing Ability of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Breeding the GP4 or M Genes ». Édité par Ralph Tripp. *PLoS ONE* 8, n° 6 (24 juin 2013): e66645.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066645>.

Zuckermann, F. A., E. A. Garcia, I. D. Luque, J. Christopher-Hennings, A. Doster, M. Brito, et F. Osorio. « Assessment of the Efficacy of Commercial Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccines Based on Measurement of Serologic Response, Frequency of Gamma-IFN-Producing Cells and Virological Parameters of Protection upon Challenge. » *Veterinary Microbiology* 123, n° 1-3 (juillet 2007): 69-85.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.009>.

Zuleger, Cindy L., Chulhi Kang, Erik A. Ranheim, Ilene D. Kurzman, Michael D. Macklin, Michael A. Newton, Jedd D. Wolchok, David M. Vail, Elof Eriksson, et Mark R. Albertini. « Pilot Study of Safety and Feasibility of DNA Microseeding for Treatment of Spontaneous Canine Melanoma ». *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician's Supplement* 3, n° 3 (août 2017): 134-45. <https://doi.org/10.1002/vms3.65>.

Annexes

VIII. Annexes

Annexe 1 – Autres publications

Identification of a novel Bluetongue virus in goats in Corsica in 2014

Bernelin-Cottet Cindy, Garnier Anabelle, Sailleau Corinne, Viarouge Cyril, Romey Aurore, Fablet Aurore, Vitour Damien, Bréard Emmanuel & Zientara Stéphan
<http://aeema.vet-alfort.fr/index.php/2013-04-12-00-44-00/epidemiologie-et-sante-animale/2015/648-2015-67-contents>

Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BTV-27 between goats

E. Bréard C. Schulz C. Sailleau C. Bernelin-Cottet C. Viarouge D. Vitour B. Guillaume G. Caignard A. Gorlier H. Attoui M. Gallois B. Hoffmann S. Zientara M. Beer

Première publication : 15 Décembre 2017 | Transbound Emerg Dis. 2018;65:e251-e263
<https://doi.org/10.1111/tbed.12780>

Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Elise Bordet, Pauline Maisonnasse, Patricia Renson, Edwige Bouguyon, Elisa Crisci, Mathieu Tiret, Delphine Descamps, Cindy Bernelin-Cottet, Céline Urien, François Lefèvre, Luc Jouneau, Olivier Bourry, Jean-Jacques Leplat, Isabelle Schwartz-Cornil & Nicolas Bertho

Publié: 05 Juillet 2018 | Scientific Reports (2018) 8:10172
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28234-y>

Annexe 2 – Liste des congrès nationaux et internationaux

Janvier 2019

Dernière assemblée annuelle du projet SAPHIR Horizon 2020, Lille, France.

Septembre 2018

6th European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), Utrecht, Pays-Bas.
5th European Congress of Immunology (ECI), Amsterdam, Pays-Bas.

Mai 2018

Troisième assemblée annuelle du projet SAPHIR Horizon 2020, Edimbourg, Ecosse.
European Veterinary Vaccinology Workshop, organisé par SAPHIR Horizon 2020, H2020 Paragone et Réseau de vaccination des vétérinaires britanniques, Edimbourg, Ecosse.

Juin 2017

Deuxième assemblée annuelle du projet SAPHIR Horizon 2020, Lelystad, Pays-Bas.

Mai 2016

Première assemblée annuelle du projet SAPHIR Horizon 2020, Ghent, Belgique.
European Veterinary Vaccinology Workshop, organisé par SAPHIR Horizon 2020, H2020
Paragone et Réseau de vaccination des vétérinaires britanniques, Ghent, Belgique.

Annexe 3 – Liste des posters présentés

Septembre 2018

ECI et EVIW

« A prime with naked ADN improves the immune responses induced by a modified live vaccine against PRRSV » (**prix meilleur poster EVIW**)

« “Immunogenicity of ADN vaccines delivered by patches and electroporation in pig skin »

Avril 2017

Journées des doctorants ABIES

« Evaluation of ADN delivery strategies for a ADN vaccination against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) »

Annexe 4 – Formations suivies et diplômes

Catégorie Communication et médiation scientifique :

Janvier 2019

Quatrième assemblée annuelle du projet SAPHIR HORIZON 2020
14 heures

Septembre 2018

ECI

42 heures

Septembre 2018

EVIW

22 heures

Mai 2018

Troisième assemblée annuelle du projet SAPHIR HORIZON 2020
19 heures

Mai 2018

European Veterinary Vaccinology Workshop, organisé par SAPHIR Horizon 2020, H2020
Paragone et Réseau de vaccination des vétérinaires britanniques, Kent, Belgique.
17 heures

Mai 2018

Rencontre doctorants-entreprise
3 heures

Juin 2017

Deuxième assemblée annuelle du projet SAPHIR HORIZON 2020
19 heures

Avril 2017

Journée ABIES
16 heures

Mai 2016

Première assemblée annuelle du projet SAPHIR HORIZON 2020
19 heures

Mai 2016

European Veterinary Vaccinology Workshop, organisé par SAPHIR Horizon 2020, H2020
Paragone et Réseau de vaccination des vétérinaires britanniques
14,5 heures

Février 2016

Carnet de compétences
2,5 heures

Journée ABIES

10 heures

Décembre 2015

Forum international professionnel des doctorants et docteurs
7 heures

Novembre 2015

Journée ABIES
4 heures

Catégorie Enseignement et pédagogie :

Mars 2016

Apprendre à enseigner : communication pédagogique
14 heures

Catégorie Ethique et intégrité scientifique

Mai 2018 Introduction à l'éthique de la recherche et intégrité scientifique
6 heures

Catégorie Formations scientifiques disciplinaires proposées par une école doctorale

Mars 2017

Diplôme Vaccinologie, Institut Pasteur, Paris, France.
140 heures

Septembre 2016

Formation à l'Expérimentation Animale niveau I, Ecole *Nationale Vétérinaire d'Alfort*,
Maison-Alfort, France.
26 + 37 heures

Total participation : 19 modules / 432 heures

Titre : Développement d'un vaccin à ADN contre le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV)

Mots clés : PRRSV, vaccin à ADN, prime-boost, APC-targeting, modes d'administration, peau

Résumé : Le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRS) est la maladie infectieuse endémique la plus couteuse en élevage porcin dont l'agent responsable est un Arterivirus, le PRRSV, qui présente une grande diversité génétique. L'infection par le PRRSV est fréquemment associée à l'infection par les virus influenza. La vaccination est une méthode de lutte adaptée contre ces virus. Dans le cas du PRRSV, les vaccins les plus utilisés sont des virus vivants modifiés (MLV) qui induisent une immunité protectrice peu efficace contre les variants viraux. Dans le cas du virus influenza, les vaccins inactivés utilisés présentent la même insuffisance.

Dans ce travail de thèse, j'ai évalué des stratégies vaccinales visant à induire une immunité efficace contre des variants viraux, en utilisant des antigènes conservés entre souches, adressés aux cellules présentatrices d'antigènes (APC), et j'ai analysé l'effet de différentes voies et modes d'administration.

Dans le cas du virus grippal, le ciblage d'antigènes conservés (HA2, M2e, NP) au CD11c a permis d'augmenter la réponse T uniquement lors d'administration par voie intramusculaire (IM) et fut sans effet sur la réponse anticorps. La vaccination par voie intradermique s'est traduit par une exacerbation de la pathologie lors d'une épreuve virale, alors que la vaccination par voie IM a réduit les symptômes, la durée d'excrétion virale en corrélation avec une meilleure réponse anticorps anti-HA2 et M2e.

Dans le cas du virus PRRSV qui fut mon sujet principal d'étude, j'ai cherché à optimiser des réponses lymphocytaires T IFN γ en employant une stratégie vaccinale ADN codant des antigènes contenant des épitopes T conservés entre souches, ciblés aux APC. En effet, alors que les mutations virales conduisent à un échappement aux anticorps neutralisants, la réponse lymphocytaire T IFN γ a été proposée impliquée dans la protection croisée.

J'ai montré que l'immunogénicité optimale de vaccins ADN PRRSV, conduisant à la réponse T la plus large, est obtenue par l'administration intradermique associée aux nanoparticules de PLGA (NP), suivi d'une électroporation (EP), par rapport à EP seul ou délivrance intradermique ou transcutanée avec des patchs à micro-aiguilles résorbables. Cette immunogénicité optimale est associée à une bonne transfection des cellules de la peau, à une accumulation de cellules inflammatoires, et à une mobilisation des cellules dendritiques. J'ai ensuite utilisé ce mode d'administration EP+NP pour immuniser des porcs avec des plasmides codant des antigènes conservés du PRRSV adressés ou non aux APC via CD11c ou XCR1. Les porcs ont été immunisés soit avec des injections répétées d'ADN seul soit en prime-boost ADN-MLV. Le régime ADN-MLV s'est montré supérieur pour l'induction de réponse B et T à celui de l'ADN ou du MLV seuls, et le ciblage aux APC a nettement augmenté la réponse anticorps mais pas la réponse T IFN γ . Dans une expérience suivante à visée d'application sur le terrain, j'ai utilisé le régime ADN-MLV (sans NP cette fois), délivré avec EP ou avec jet sous pression (PJ). Dans ces conditions, la primo-vaccination avec ADN n'a pas significativement augmenté la réponse T IFN γ induite par le MLV, mais elle a clairement augmenté la réponse anticorps avec un bénéfice du ciblage des APC. L'immuno-potentialisation induite par la primo-vaccination ADN n'a pas conduit à l'amélioration de la protection contre une épreuve avec un virus hétérologue et a montré que cette protection n'est au final pas corrélée avec la réponse lymphocytaire T IFN γ et opère en l'absence d'anticorps neutralisants détectables. Enfin, l'ensemble de ce travail montre que l'effet du ciblage des APC chez le porc est influencé par la voie d'administration et par le régime d'administration comme le prime-boost ADN-MLV.

Title : Development of a DNA vaccine against the Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV)

Keywords : PRRSV, DNA vaccine, prime-boost, APC-targeting, delivery methods, skin

Abstract : The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is the most damaging infectious disease in pigs worldwide. The etiologic agent is an Arterivirus, the PRRSV, which presents a large genetic diversity. PRRSV infection is frequently associated with influenza virus co-infection.

Vaccination is a highly suitable way to control these viruses. In the case of PRRSV, the most effective commercial vaccines are modified live vaccines (MLV) which induce only a partial protection against heterologous strains. In the case of the influenza virus, the available inactivated vaccines show the same weakness.

With the goal to control emerging influenza and PRRSV variants, I evaluated vaccine strategies involving conserved viral antigens between strains which were targeted to antigen-presenting cells (APC) and delivered by different routes and methods.

In the case of influenza virus, the targeting of conserved antigens (HA2, M2e, NP) to CD11c led to increased IFN γ T cell responses only when vaccines were delivered by the intramuscular (IM) route and had no effect on the humoral response. The intradermal route exacerbated disease following challenge whereas the IM route reduced the symptoms, the duration of viral excretion in correlation with higher anti-HA2 and anti-M2e antibody responses.

In the case of PRRSV, which was my main subject, I sought to optimize the IFN γ T cell responses by using DNA vaccines encoding antigens with conserved T-epitopes between strains, and targeted to APC. Indeed, whereas viral mutants escape neutralizing antibodies, it has been proposed that the IFN γ T cell responses are instrumental for cross-protection. I showed that the broadest T cell responses were induced by DNA vaccines combined to nanoparticles PLGA (NP) injected by the intradermal

route, followed by electroporation (EP) compared with EP-only, intradermal route-only or transcutaneous dissolvable microneedles. This optimal immunogenicity was associated with a high transfection level of skin cells, an accumulation of inflammatory cells, and dendritic cells mobilisation. Next I used the EP+NP method to immunize pigs with plasmids encoding conserved PRRSV antigens targeted or not to APC via CD11c or XCR1. Pigs were immunized either with repeated injections of DNA alone or with a prime-boost DNA-MLV. The DNA-MLV regimen induced improved humoral and IFN γ T cell responses compared to DNA alone or MLV alone and the APC-targeting significantly increased the humoral response but not the IFN γ T cell response. Finally, I evaluated the DNA-MLV regimen efficacy, with an applied perspective, using naked DNA without NP and delivered by EP or by a convenient needle free injection technology (PJ). In these conditions, the DNA prime did not significantly increase the IFN γ T cell response induced by the MLV, but clearly increased the humoral response with a benefit of the APC-targeting. However, the immune potentiation induced by the DNA prime did not lead to an improved protection following a heterologous challenge. The heterologous protection was not correlated to the measured humoral and IFN γ T cell responses, and neutralizing antibodies were undetectable. Thus cross-protective effectors have not been sufficiently activated by our DNA-MLV strategy and the immune correlates of protection against heterologous PRRSV are still to be identified to develop cross-protective vaccines. Finally, this work shows that the effect of APC-targeting in pigs is influenced by delivery routes and methods and by vaccine regimen such as the prime-boost DNA-MLV.

